

**Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie  
der Anatomischen Anstalt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz**

**Dichte von Mikrogefäßen im Kleinhirn beim  
plötzlichen Kindstod**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Jens Matthias Müller-Starck  
aus Göttingen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christoph Schmitz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Florian Heinen Prof. Dr. Rainer Glaß Prof. Dr. Birgit Ertl-Wagner
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser; FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	26.06.2014

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1 Untersuchtes Material	5
2.2 Histologische Aufarbeitung	7
2.3 Stereologische Auswertungen	14
2.3.1 Einführung in die <i>design-based</i> Stereologie	14
2.3.2 Aufbau des verwendeten Stereologiesystems	20
2.3.3 Verblindete Datenerhebung	20
2.3.4. Untersuchte Kleinhirnschichten	20
2.3.5. Bestimmung der Mikrogefäßlängendichte in einer Kleinhirnschicht mit der <i>Space Balls</i> Methode	22
2.3.6. Bestimmung des Volumens einer Kleinhirnschicht mit der Cavalieri Methode	25
2.4 Statistische Analyse	25
2.5 Fotografie	26
3. Ergebnisse	28
3.1 Alter, Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=9 SIDS-Fälle und der n=14 Kontrollen	28
3.2 Volumina der untersuchten Kleinhirnschichten	30
3.2.1 Tabellarische Übersicht über alle Ergebnisse	30
3.2.2 Statistische Analyse der Volumina der n=14 Kontrollen	32
3.2.3 Statistischer Vergleich der Volumina der n=9 SIDS-Fälle und der n=9 gematchten Kontrollen	35

3.3 Mikrogefäßlängendichten der untersuchten Kleinhirnschichten	40
3.3.1 Histologische Übersicht	40
3.3.2 Tabellarische Übersicht über alle Ergebnisse	43
3.3.3 Statistische Analyse der Mikrogefäßlängendichten der n=14 Kontrollen	44
3.3.4 Statistischer Vergleich der Mikrogefäßlängendichten der n=9 SIDS-Fälle und der n=9 gematchten Kontrollen	48
3.4 Immunhistochemischer Nachweis von GFAP	53
4. Diskussion	56
4.1 Validität der Ergebnisse	56
4.2 Mikrogefäßlängendichte des Kleinhirns bei SIDS	59
4.3 Mikrogefäßlängendichte des Kleinhirns während des ersten Lebensjahres	63
4.4 Schichtenspezifische Unterschiede der Mikrogefäßlängendichte des Kleinhirns	64
4.5 Unterschiede in der Entwicklung der Mikrogefäßlängendichte des Kleinhirns zwischen Mensch und Ratte	65
4.6 Abschließende Bemerkungen	68
5. Zusammenfassung	69
6. Literatur	72
7. Danksagung	78
8. Eidesstattliche Versicherung	79

# 1. Einleitung

Der plötzliche Kindstod - im Folgenden durchgehend als SIDS („sudden infant death syndrome“) bezeichnet - wurde von Willinger et al. (1991) und Moon et al. (2007) definiert als „der plötzliche Tod eines Kindes im Alter von unter einem Jahr, der nach einer Untersuchung des Falles mit kompletter Autopsie, Prüfung der Todesumstände und Überprüfung der Krankengeschichte ungeklärt bleibt“ (vgl. auch Biondo et al., 2003; Berul und Perry, 2007; Kinney, 2009). Bei SIDS wird ein Kind ohne vorher ersichtliche Zeichen einer Erkrankung häufig nach einer vorausgehenden Schlafphase tot aufgefunden (Ansari et al., 2002; Bajanowski und Poets, 2004; Byard und Krous, 2004; Kinney, 2009). Es scheint so, dass die Kinder einfach aufhören zu atmen (Guilleminault et al., 1975). Obwohl die Zahl von SIDS-Fällen in der Bundesrepublik Deutschland im Laufe der letzten Jahre rückläufig ist (siehe Tabelle 1.1), ist SIDS weiterhin eine der häufigsten Ursachen für Kindstod im ersten Lebensjahr (siehe Statistisches Jahrbuch 2013). Das Verhältnis (genauer gesagt sein Mittelwert der in Tabelle 1.1 gezeigten Zahlen) an SIDS verstorbenen Jungen zu Mädchen liegt bei 61:39. Diese für die Bundesrepublik Deutschland geltenden Zahlen lassen sich auch international wiederfinden. So wurde von Moon et al. (2007) ein Verhältnis von 60:40 (Jungen zu Mädchen) angegeben.

**Tabelle 1.1:** Anzahl Lebendgeburten und Fallzahlen für SIDS ausgewählter Jahrgänge in der Bundesrepublik Deutschland. Quelle: Statistisches Jahrbuch (2006, 2009, 2012, 2013) des statistischen Bundesamtes.

Jahr	Lebendgeburten	SIDS-Fälle		
		Gesamt	Jungen	Mädchen
2011	662.685	147	94	53
2010	677.947	164	103	61
2007	684.862	228	138	90
2004	705.622	323	200	123

Eine kürzlich an fünf großen Fall-Kontroll-Studien durchgeführte Metaanalyse mit 1472 SIDS-Fällen und 4679 Kontrollen (Carpenter et al., 2013) zeigte auf, dass alleine das Teilen des Bettes zwischen Eltern und Kind das SIDS-Risiko erhöht. Zu einer weiteren Risikoerhöhung kommt es nach den Daten der o. g. Metaanalyse, wenn die Mutter bzw. die Eltern rauchen bzw. Medikamente oder Alkohol zu sich nehmen (Carpenter et al., 2013).

Da bis heute keine eindeutige Ursache für SIDS gefunden werden konnte, obwohl eine Reihe von Organsystemen untersucht wurde, ist SIDS nach wie vor eine Ausschlussdiagnose (Byard und Krous, 2004; Siren und Siren, 2011; Evans et al., 2013).

Dies hat zu intensiver Forschung in den verschiedensten Organsystemen des Körpers geführt. Im Folgenden seien einige davon beispielhaft aufgeführt:

1. Das Atemzentrum im Gehirn inklusive der weiteren an der neuronalen Kontrolle der Atmung beteiligten Gehirnregionen (z. B. Guilleminault et al., 1975; Kinney, 2009; Paterson et al. 2009).
2. Das Zwerchfell (Lamont et al., 1995; Weis et al. 1998; Siren und Siren 2011), die Lunge (z. B. Haque et al., 1991) nebst möglichen Surfactantveränderungen (z. B. Hills et al., 1995), sowie die glatte Muskulatur der unteren Atemwege (z. B. Elliot et al., 1999).
3. Das Herz-Kreislauf-System (z. B. Anderson et al., 1974; Maron et al., 1976; Wedekind et al., 2006; Witcombe et al., 2012).
4. Weitere Untersuchungen am Zentralnervensystem (z. B. Wünscher et al., 1971; Takashima et al., 1978; Kinney, 2009); dabei auch Untersuchungen zum Vorkommen leptomeningealer Neurone als Marker von neuronalen Entwicklungsstörungen (Rickert et al., 2009).
5. Die Schilddrüse (Risse und Weiler, 1984), die Bauchspeicheldrüse (z. B. Hisaoka et al. 1992) und die Nebennieren (z. B Pérez-Platz et al., 1994).
6. Die Beteiligung von Zytokinen als Marker für Entzündungen (z. B. Vennemann et al., 2012).

Insgesamt konnte bis heute kein einheitlicher Befund und insbesondere kein kausaler Zusammenhang zwischen den Ergebnissen dieser Untersuchungen und SIDS festgestellt werden. So wurde u. a. auf Grund von Untersuchungen wie denen von Mitchell et al. (1991), in der neben anderen Faktoren die Schlaflage des Kindes als Risikofaktor für SIDS gewertet wurde, in den USA 1992 das „Back to Sleep“ Programm des „U.S. National Institute of Child Health & Human Development“ ([www.nichd.nih.gov/sts/](http://www.nichd.nih.gov/sts/); zuletzt zugegriffen am 28.01.2014) gestartet. 2012 wurde dieses Programm ausgeweitet und in „Safe to Sleep“ umbenannt. ([www.nichd.nih.gov/sts/campaign/moments/Pages/2004-2013.aspx/](http://www.nichd.nih.gov/sts/campaign/moments/Pages/2004-2013.aspx/); zuletzt zugegriffen am 28.01.2014). Dieses Programm beinhaltet die Empfehlungen, dass Kinder in Rückenlage, mit fester Schlafoberfläche, mit geeigneter Schlafbekleidung, ohne Kissen, Spielzeuge und andere weiche Zubehörartikel, mit nicht bedecktem Kopf, im eigenen Bett und ohne Rauchexposition schlafen sollten, um das Risiko eines SIDS bedingten Todes zu minimieren. Ausgehend von der Hypothese, dass SIDS durch fehlende Atemtätigkeit einerseits oder durch fehlende neuronale Kontrolle des Atem- und Kreislaufzentrums andererseits verursacht sein könnte (z. B. Paterson et al., 2009), rückte die Untersuchung des Hirnstamms mit in den Fokus der Forschung (Kinney, 2009). Auch hier wurden etliche

Einzelbefunde erstellt, jedoch konnten keine einheitlichen Befunde mit einem übergeordneten Kausalzusammenhang gefunden werden.

Da bei SIDS, wie eingangs erwähnt, die Kinder einfach aufhören zu atmen (Guilleminault et al., 1975) und das Kleinhirn an der respiratorischen und kardiovaskulären Kontrolle beteiligt ist (z. B. Harper et al., 2000), wurde es mehrfach in Hinblick auf mögliche pathologische Veränderungen bei SIDS untersucht, und dabei insbesondere auf Zeichen von Hypoxie. Oehmichen et al. (1989) stellten in ihrer Untersuchung keine Anzeichen von Hypoxie bei SIDS-Fällen im Kleinhirn fest. Dem entgegen fanden Jones et al. (2003) in ihrer Untersuchung an 51 SIDS-Fällen im Vergleich zu 33 Kontrollen eine höhere Konzentration an VEGF (vascular endothelial growth factor) im Liquor von SIDS-Fällen. Der Zusammenhang zwischen Hypoxie und VEGF konnte von Xu und Severinghaus (1998) bei Ratten verdeutlicht werden. In dieser Studie war die Expression von VEGF bei Hypoxie verstärkt im Vergleich zu einer normoxischen Kontrollgruppe. Darüber hinaus beschrieben Boero et al. (1999) eine verstärkte Kapillarisierung im Gehirn bei Mäusen, die einem Sauerstoffdefizit ausgesetzt waren (Details werden in Kapitel 4. Diskussion erläutert). Demzufolge könnten SIDS-Fälle im Kleinhirn bei Vorliegen einer Hypoxie eine vermehrte Kapillarisierung aufweisen.

Die Purkinjezellen als einzige Quelle efferenter Verbindungen der Kleinhirnrinde (Squire et al., 2008) wie auch das Kleinhirn insgesamt wurden in den vergangenen Jahren ebenfalls intensiv im Zusammenhang mit SIDS untersucht (z. B. Riedel et al., 1989; Cruz-Sánchez et al., 1997; Lavezzi et al., 2007). Von Kiessling et al. (2013b) wurde gezeigt, dass keine Unterschiede der Purkinjezellzahl bei SIDS-Fällen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vorlagen. In einer *post mortem* Studie an Patienten, die an akuter Hypoxie verstorben waren, konnte von Bartschat et al. (2012) dargestellt werden, dass bei diesen Fällen eine sinkende Konzentration von Calbindin-D28k in den Purkinjezellen vorlag. Calbindin-D28k ist ein Calcium bindendes Protein, welches im Zytosol von Purkinjezellen und anderen Neuronen exprimiert wird. Dort dient es als verlässlicher Marker zur Diagnose von akuter Hypoxie (Bartschat et al., 2012). Kiessling et al. (2013b) zeigten in Untersuchungen mit demselben Marker, dass bei SIDS kein Hinweis auf akute Hypoxie der Purkinjezellen vorlag. Die von Kiessling et al. (2013b) untersuchten Kleinhirnhälften waren dieselben wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kleinhirnhälften; allerdings wurden in der hier vorliegenden Arbeit andere Kleinhirnschnitte untersucht als von Kiessling et al. (2013b).

Vor dem Hintergrund der hier vorgestellten Literatur erschien es lohnenswert, die Frage möglicher hypoxischer Veränderungen am Kleinhirn bei SIDS weiter zu überprüfen. Dazu wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine sogenannte *design-based* stereologische

Untersuchung an Kleinhirnhälften hinsichtlich der Mikrogefäßlängendichte<sup>1</sup> - einem stereologischen Marker für chronische Hypoxie - durchgeführt. Konkret wurden die verschiedenen Kleinhirnschichten (äußere Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, innere Granularzellschicht und weiße Substanz) mit Hilfe der *Space Balls* Methode (Calhoun und Mouton, 2001; Mouton et al., 2002) analysiert. Dabei wurde die folgende **Hypothese** überprüft:

Die mittlere Mikrogefäßlängendichte im Kleinhirn ist bei SIDS-Fällen höher als bei einer alters- und geschlechtsgemachten Kontrollgruppe, als Ausdruck einer chronischen subklinischen Hypoxie.

---

<sup>1</sup> Im Folgenden wird der Begriff „Mikrogefäße“ statt dem Begriff „Kapillaren“ verwendet, da der verwendete immunhistochemische Nachweis für Kollagen zum Anfärben der Mikrogefäße nicht geeignet ist, ausschließlich Kapillaren nachzuweisen. Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist dies jedoch ohne Relevanz.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Untersuchtes Material

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten menschlichen Kleinhirnhälften wurden in den Jahren 1999 bis 2001 durch Herrn Univ. Prof. Dr. med. Andreas Büttner (heute Direktor des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Rostock) am Institut für Rechtsmedizin der LMU München gesammelt und bis 2011 in einer 10%igen Formalinlösung gelagert, die pH-Wert neutral gepuffert war. Für die Verwendung dieser menschlichen Kleinhirne in der vorliegenden Untersuchung liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock vor (Registriernummer A 2012-0053). Das Originaldokument dieses Votums befindet sich in der Anatomischen Anstalt der LMU München und kann jederzeit eingesehen werden.

Es wurde jeweils eine Kleinhirnhälfte von n=9 SIDS-Fällen sowie von n=14 Kontrollen untersucht. Den n=9 SIDS-Fällen wurden an Hand des Alters und des Geschlechts n=9 gematchte Kontrollen aus dem Kollektiv der n=14 Kontrollen zugeordnet. Das Alter, Geschlecht, das *post mortem* Intervall, die untersuchte Kleinhirnhälfte und die Diagnose der n=14 Kontrollen sowie der n=9 SIDS-Fälle sind den Tabellen 2.1 und 2.2 zu entnehmen.

**Tabelle 2.1:** Fallnummer<sup>2</sup>, Alter, Geschlecht, *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Obduktion) [PMI] und untersuchte Kleinhirnhälfte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten n=9 SIDS-Fälle. m: männlich; w: weiblich. MW: Mittelwert aller n=9 SIDS-Fälle; StAbw: Standardabweichung aller n=9 SIDS-Fälle; StF: Standardfehler des Mittelwertes aller n=9 SIDS-Fälle.

Fallnummer	Alter [Monate]	Geschlecht	PMI [Stunden]	Untersuchte Kleinhirnhälfte
10/67	2	m	24	links
10/50	3	m	56	links
10/68	3	m	18	links
10/54	6	m	39	links
10/55	7	m	33	links
10/47	9	w	64	links
10/73	10	m	5	links
10/78	10	w	32	links
10/88	10	w	6	links
MW	6,7		30,8	
StAbw	3,3		20,3	
StF	1,1		6,8	

<sup>2</sup> Diese internen Fallnummern wurden nach Eingang der Kleinhirnhälften in der Anatomischen Anstalt der LMU München neu vergeben, um die Möglichkeit einer „Ent-Anonymisierung“ der untersuchten SIDS-Fälle und Kontrollen auszuschließen.

Die Ausschlussdiagnose SIDS wurde nach polizeilicher Prüfung der Todesumstände, einer Untersuchung des Falles mit kompletter Autopsie, histologischer, mikrobiologischer und toxikologischer Untersuchung durch das Institut für Rechtsmedizin der LMU München nach der San Diego Klassifikation festgestellt (Krous et al., 2004).

**Tabelle 2.2:** Fallnummer, Alter, Geschlecht, *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Obduktion) [PMI], untersuchte Kleinhirnhälfte und Diagnose der n=14 in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kontrollen. Bei den mit \* markierten Fallnummern handelt es sich um die n=9 gematchten Kontrollen. m: männlich; w: weiblich. MW: Mittelwert aller n=14 Kontrollen; StAbw: Standardabweichung aller n=14 Kontrollen; StF: Standardfehler des Mittelwertes aller n=14 Kontrollen. MW\*: Mittelwert der n=9 gematchten Kontrollen; StAbw\*: Standardabweichung der n=9 gematchten Kontrollen; StF\*: Standardfehler des Mittelwertes der n=9 gematchten Kontrollen.

Fallnummer	Alter [Monate]	Geschlecht	PMI [Stunden]	Untersuchte Kleinhirn- hälfte	Diagnose
10/46	0,03	w	33	rechts	Ersticken
10/76	0,03	w	10	links	Erwürgen
10/70	0,83	m	42	links	Tötung (Ersticken)
10/79*	1,5	m	36	links	Herzfehler
10/71*	3	m	28	rechts	Infekt
10/80*	3	m	27	links	Waterhouse- Friderichsen Syndrom
10/99*	4	m	25	rechts	Unklar
10/92*	7	m	11	links	Erwürgen
10/64	8	m	53	links	Otitis media
10/84*	9	w	29	links	MCAD-Syndrom / Adrenogenitales Syndrom
10/45*	10	m	29	links	Sepsis
10/58*	10	w	76	links	CO-Intoxikation
10/65*	10	w	7	links	Myokarditis
10/77	11	m	56	links	Herzfehler
MW	5,53		33,0		
StAbw	4,15		19,0		
StF	1,11		5,1		
MW*	6,39		29,8		
StAbw*	3,52		19,6		
StF*	1,17		6,5		

## 2.2 Histologische Aufarbeitung

Die ca. 10 Jahre in Formalin gelagerten Kleinhirnhälften wurden, je nach Größe des Kleinhirns, bis zu einer Woche unter fließendem Leitungswasser gewässert. Danach wurden sie in aufsteigender Konzentration in 10%, 20% und 30% Sucrose (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) in 0,1M TBS Lösung bei pH 7,4 und 4°C eingelegt. Die TBS Lösung wurde wie folgt hergestellt: 24,2 g Tris ultra pur (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) wurden zusammen mit 17,0 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1,9 Liter Aqua dest. gelöst; anschließend wurde die Lösung mit Eisessig (= 100% Essigsäure, Merck) auf pH 7,4 eingestellt und dann mit Aqua dest. auf 2 Liter aufgefüllt. Sobald die Kleinhirnhälften in der jeweiligen Lösung vollständig abgesunken waren, wurden sie in die Lösung mit der nächsthöheren Sucrosekonzentration eingelegt. Danach wurden die Kleinhirnhälften in Alufolie eingewickelt und mit zerkleinertem Trockeneis oder CO<sub>2</sub> Schaum eingefroren. Nach vollständigem Durchfrieren wurden sie auf den Halter eines Kryostaten (Leica CM 1950; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mittels Frozen Section Medium (Neg 50; Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) aufgeblickt. Von den gefrorenen Kleinhirnhälften wurden bei einer Temperatur von -20°C im Innenraum des Kryostaten und einer Temperatur des Probenhalters von -18°C Sagittalschnitte von 100 µm Dicke erstellt. Dabei wurden die folgenden Mikrotomklingen verwendet: C 35 (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan). Je nach Größe der Schnitte wurden diese entweder auf Superfrost plus Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) oder auf mit Gelatine beschichtete Objektträger (Menzel) aufgezogen und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Messerhalter wurde nach jedem Schnitt abgepinselt und nach jeweils 10 Schnitten mit 100% unvergälltem Ethanol gesäubert. Zur Herstellung der mit Gelatine beschichteten Objektträger wurden die Glasobjektträger in der Spülmaschine gereinigt und bei 37 °C für 1 Stunde im Brutschrank getrocknet. Dann wurde die Gelatine angerührt (50 g gepulverte Gelatine (Merck) in 1000 ml Aqua dest. gelöst und langsam auf 60 °C erwärmt). Nach dem Abkühlen der Lösung wurde 0,32 g Chromalaun (Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat; Merck) hinzugegeben und die Lösung in ein Glasgefäß filtriert. Im Anschluss wurden die Objektträger für ca. 2 Sekunden in die Gelatinelösung eingetaucht und anschließend auf einem Tuch abgetropft. Über Nacht wurden sie bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger für 30 Minuten in eine 4,5 %ige Formaldehydlösung (pH 7, säurefrei, phosphatgepuffert; Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und über Nacht unter den Abzug zum Ausdampfen gestellt.

Für die *design-based* stereologischen Untersuchungen wurde aus den Schnitten jeder Kleinhirnhälfte jeweils eine Serie von Schnitten mit gleichem Abstand zueinander herausgesucht, und zwar so, dass für jede Kleinhirnhälfte genau fünf Schnitte untersucht wurden (Tabelle 2.3). Lediglich bei den Fällen 10/71 und 10/88 (dies waren die beiden ersten

untersuchten Kleinhirnhälften) wurden jeweils sechs Schnitte untersucht. Die Nummer des jeweils ersten Schnittes wurde für jede untersuchte Kleinhirnhälfte zufällig gewählt, mit der Maßgabe, dass dieser jeweils erste Schnitt eine Nummer hatte, die kleiner war als der Schnittabstand der untersuchten Serie. Konnten einzelne Schnitte der herausgesuchten Serie bedingt durch Artefakte nicht untersucht werden (dies war bei den Fällen 10/50 und 10/78 der Fall), wurden sie durch benachbarte Schnitte ersetzt. Diese Art des Anlegens von Schnittserien nennt man in der *design-based* Stereologie „systematic and random sampling“ (vgl. Schmitz und Hof, 2005). Systematisch ist dabei der jeweils gleiche Schnittabstand; zufällig ist die Position der Schnittserie in Bezug auf die untersuchte Kleinhirnhälfte, ausgedrückt durch die Nummer des jeweils ersten Schnittes.

**Tabelle 2.3:** Untersuchte Schnittserien.

Fallnummer	Schnitt Nr.						Schnittabstand
	1	2	3	4	5	6	
10/67	22	94	166	238	310	-	72
10/50	10	98	184	271	358	-	87
10/68	35	107	179	251	323	-	72
10/54	5	98	191	284	377	-	93
10/55	36	108	180	252	324	-	72
10/47	85	157	229	301	373	-	72
10/73	35	107	179	251	323	-	72
10/78	59	155	252	347	443	-	96
10/88	34	106	178	250	322	394	72
10/46	15	75	135	195	255	-	60
10/76	20	74	128	182	236	-	54
10/70	15	93	171	249	327	-	78
10/79	35	107	179	251	323	-	72
10/71	10	82	154	226	298	370	72
10/80	46	106	166	226	286	-	60
10/99	38	110	182	254	326	-	72
10/92	12	108	204	300	396	-	96
10/64	35	131	227	323	419	-	96
10/84	35	107	179	251	323	-	72
10/45	11	107	203	299	395	-	96
10/58	60	132	204	276	348	-	72
10/65	59	131	203	275	347	-	72
10/77	59	131	203	275	347	-	72

Im nächsten Schritt wurde eine immunhistochemische Behandlung der Schnitte zum Nachweis von Kollagen IV durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte aus der Kühltruhe genommen und über den Zeitraum von drei Tagen bei 55°C auf einer Heizplatte (Medax, Neumünster, Deutschland) getrocknet. Diese Trocknung auf der Heizplatte diente einerseits der besseren Anhaftung des Gewebes auf den Objektträgern und andererseits (im Vergleich zu einem Wärmeschränk) durch die von unten kommende Wärme dem besseren Gewebeerhalt. Danach wurden die Schnitte zur Entfettung in eine aufsteigende Ethanolreihe eingebracht (70%, 90% für je 2 Stunden) und anschließend über Nacht in 100% Ethanol gelagert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte bei Raumtemperatur je 15 Minuten in eine absteigende Ethanolreihe (90%, 70%) gebracht und danach kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurden sie in 1% Saponin (Sigma-Aldrich Chemie) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 10 Minuten zur Permeabilisierung eingestellt und erst mit Leitungswasser und dann mit PBS gespült. Die Herstellung von 1 Liter PBS-Lösung

(0,01 M PBS mit 0,15 M NaCl, pH 7,4) erfolgte wie folgt: 8,77 g NaCl (Merck) in 900 ml Aqua dest. lösen, 10 ml von „Lösung A“ (27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  / 1000 ml Aqua bidest.; Merck) und 40 ml von „Lösung B“ (35,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  / 1000 ml Aqua bidest.; Merck) zugeben, den pH-Wert mit „Lösung B“ auf 7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Die einzelnen Schritte des immunhistochemischen Nachweises von Kollagen IV sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst. Der Primärantikörper M3F7 ( $\alpha$  Kollagen IV, Spezies Maus, monoklonal) stammte von der Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA, USA). Dieser Antikörper erkennt die helikalen Domänen der  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Ketten von Kollagen IV, welches in einer Vielzahl von vaskulären und epithelialen Basalmembranen exprimiert wird (Foellmer et al., 1983).

Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit einer Cresylviolett-Färbung (Details in Tabelle 2.5). Abschließend wurden die Schnitte mit Malinol (Waldeck Division Chroma, Münster, Deutschland) eingedeckelt.

Für jede untersuchte Kleinhirnhälfte wurde darüber hinaus an einigen zusätzlichen Schnitten (d.h., nicht an den in Tabelle 2.3 genannten Schnitten) aus dem Vermis ein immunhistochemischer Nachweis von GFAP („glial fibrillary acidic protein“) durchgeführt (Primärantikörper: ab4648, Spezies Maus, monoklonal; Abcam, Cambridge, MA, USA), mit dessen Hilfe Astrozyten nachgewiesen werden können (siehe z. B. Eng, 1985). Astrozyten stellen z. B. bei langanhaltender Hypoxie eine Möglichkeit des Nervengewebes dar, abgestorbene Bereiche mit gliösen Narben zu ersetzen und eignen sich daher gut, um chronische Hypoxie immunhistochemisch darzustellen (Pekny und Nilsson, 2005). Zum immunhistochemischen Nachweis von GFAP wurden die entsprechenden Schnitte 3 Tage auf einer Heizplatte (Medax) getrocknet und anschließend zur Entfettung in eine aufsteigende Ethanolreihe eingebracht (70% und danach 96% für je 2 Stunden). Über Nacht verblieben die Schnitte in 96% Ethanol, um am folgenden Tag in 70% Ethanol 15 Minuten umgelagert zu werden. Anschließend wurden sie kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Als nächstes wurden sie in der Mikrowelle bei ca. 640 W 2 x 5 Minuten mit 0,01 M Citratpuffer pH 6 – bestehend aus 9 ml Lösung A: 21,0 g Citronensäure-Monohydrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) in 1000ml Aqua bidest.; 41 ml Lösung B: 29,4 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) in 1000 ml Aqua bidest. und 450 ml Aqua dest. – demaskiert, mit PBS gespült und mit 1% Saponin in PBS-Lösung für 10 Minuten permeabilisiert. Nachfolgend wurden die Schnitte mit Leitungswasser und dann mit PBS gespült. Die Herstellung von PBS ist im vorherigen Absatz beschrieben. Die folgende Peroxidase-Blockierung sowie weitere Schritte der immunhistochemischen Behandlung sind in Tabelle 2.6 zusammengestellt. Die Gegenfärbung der Schnitte wurde mit einer Cresylviolett-Färbung (Details in Tabelle 2.5) durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte mit Malinol (Waldeck Division Chroma) eingedeckelt.

**Tabelle 2.4:** Arbeitsablauf des immunhistochemischen Nachweises von Kollagen IV.

Arbeitsschritt	Chemikalien	Ansatz	Zeit
Entfetten	Ethanolreihe	70%, 90%, 100% und zurück bis 70%, kurz Aqua dest.	
Permeabilisierung	Saponin, 1% in PBS	0,1 g auf 10 ml	10 min
Spülen	Kurz in Leitungswasser, dann in PBS		3 x 5 min
Demaskierung	Pepsin 0,5%	0,025g / 5ml 0,01N HCl	25 min bei 37°C
Spülen	Kurz in Leitungswasser, dann in PBS		3 x 10 min
Peroxidase-Block	1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBS	290 ml PBS + 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	45 min
Spülen	in PBS		3 x 5 min
Blockierung	3% GOS in PBS- Tween-BSA	1 ml PBS-Tween-BSA + 30 µl GOS	30 min
Inkubation mit Primärantikörper M3F7 α Collagen IV	In PBS-Tween-BSA	1000 µl PBS-Tween-BSA + Primärantikörper (1:20 bis 1:50)	5 h bei RT, über Nacht bei 4 °C
Spülen	In PBS		3 x 10 min
Inkubation mit Biotin konjugiertem Zweitantikörper	Goat anti mouse (1:200) in 3% GOS, in PBS- Tween-BSA	1 ml PBS-Tween-BSA + 30 µl GOS + 5 µl Zweitantikörper	2 h
Spülen	In PBS		3 x 10 min
Enzymreaktion	Avidin-Komplex (1:50) in PBS-Tween	1 ml PBS-Tween + 10 µl A + 10µl B, 30 Min. vorher herstellen	2 h
Spülen	In PBS		3 x 10 min
Visualisierung	DAB	1 ml DAB + 2 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	15 min
Spülen	Kurz in Aqua dest., dann in PBS		2 x 5 min

PBS: phosphatgepufferte Salzlösung (Merck). Tween: nichtionisches Tensid (Sigma-Aldrich Chemie). PBS-Tween: 0,1% Tween gelöst in PBS. BSA: bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich Chemie). PBS-Tween-BSA besteht aus 100 ml PBS + 0,1 ml Tween + 3 g BSA. Saponin: Detergenz (Sigma-Aldrich Chemie). Pepsin: enzymatische Demaskierung (Sigma-Aldrich Chemie). HCl: Salzsäure (Merck). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid (Merck). GOS: Ziegenullserum (Sigma-Aldrich Chemie). Primärantikörper M3F7 α Collagen IV (University of Iowa, Department of Biology). Die verwendete Verdünnung des Primärantikörpers lag zwischen 1:20 bis 1:50, abhängig von der individuellen Anfärbbarkeit der jeweiligen Kleinhirnhälfte. Biotin konjugierter Zweitantikörper goat anti mouse IgG (Vector # BA9200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Avidin-Komplex (Vectastain ABC

Kit # PK 4000, 1:50, Vector Laboratories). DAB: Diaminobenzidin, Ansatz: 10 mg DAB (Merck) in 15 ml PBS gelöst. RT: Raumtemperatur.

**Tabelle 2.5:** Arbeitsablauf der Cresylviolett-Färbung.

Arbeitsschritt	Chemikalien	Ansatz	Zeit
Spülen	In Aqua dest.		Kurz
Färben	Cresylviolett Acetat-Lsg. in Acetatpuffer bei pH 3,8		25-35 sek
Spülen	Aqua dest.		Kurz
Entwässern	Aufsteigende Ethanolreihe	70% + 3 Tropfen Eisessig zur schnelleren Differenzierung, 70%, 90%, 96% bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes, 100% , 100%	Bis das gewünschte Ergebnis (unter mikroskopischer Kontrolle) erreicht ist
Intermedium	Xylol		2 x 10 min
Eindeckeln	Malinol		Aushärtungszeit bis zu 3 Tage

Zum Ansatz der Farbstammlösung wurden 0,5 g Cresylviolett Acetat (Waldeck Division Chroma, Münster, Deutschland) in 100 ml Acetatpuffer gelöst. Der Acetatpuffer bestand aus folgenden Komponenten: Lösung A: 2,721 g Natriumacetat • 3 H<sub>2</sub>O (Merck) gelöst in 100 ml Aqua dest., Lösung B: 4,804 ml Eisessig (Merck) in 400 ml Aqua dest. Mischen beider Lösungen und Einstellung auf pH 3,8 mit Eisessig (Merck). Die Farbgebrauchslösung wurde durch Mischung von Farbstammlösung und Acetatpuffer im Verhältnis 1:1 hergestellt und filtriert. Xylol: Intermedium (Merck). Malinol: Einschlussmittel (Waldeck Division Chroma)



**Tabelle 2.6:** Arbeitsablauf des immunhistochemischen Nachweises von GFAP.

Arbeitsschritt	Chemikalien	Ansatz	Zeit
Entfetten	Ethanolreihe	70%, 96% und zurück bis 70%, kurz Aqua dest.	
Demaskierung	Citratpuffer	Lsg. A 9 ml + Lsg. B 41 ml + 450 ml A. dest bei pH 6	2 x 5 min. in der Mikrowelle bei ca. 640 W
Spülen	in PBS		5 min
Entfetten	1% Saponin in PBS	1g Saponin + 100 ml PBS	10 min
Spülen	in Leitungswasser		5 min
Spülen	in PBS		5 min
Peroxidase-Block	1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBS	290 ml PBS + 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	45 min
Spülen	in PBS		5 min
Blockierung	5% GOS in PBS-Tween	1 ml PBS-Tween + 50 µl GOS	30 min
Inkubation mit Primärantikörper GFAP 2A5 ab4648	1:50 in PBS-Tween	98 µl PBS-Tween + 2 µl Primärantikörper	20 min bei 37 °C, dann 2 h bei RT, über Nacht bei 4°C
Spülen	in PBS		3 x 5 min
Inkubation mit Biotin konjugiertem Zweitantikörper	Goat anti mouse 1:200 in 5 % GOS, in PBS-Tween	1 ml PBS-Tween + 50 µl GOS + 5µl Zweitantikörper	90 min bei 26 °C
Spülen	in PBS		3 x 5 min
Enzymreaktion	Avidin-Komplex in PBS-Tween	1 ml PBS-Tween + 10 µl A + 10 µl B, 30 Min. vorher herstellen	90 min bei 26 °C
Spülen	in PBS		3 x 5 min
Visualisierung	DAB	1 ml DAB + 2 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	15 min
Spülen	In Aqua dest.		2 x 5 min

PBS: phosphatgepufferte Salzlösung (Merck). Tween: nichtionisches Tensid (Sigma-Aldrich Chemie). PBS-Tween: 0,1% Tween gelöst in PBS. Der Citratpuffer (pH 6,0) bestand aus 9 ml Lösung A: 21,0 g Citronensäure-Monohydrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> • H<sub>2</sub>O) in 1000ml Aqua bidest.; 41 ml Lösung B: 29,4 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> • 2 H<sub>2</sub>O) in 1000 ml Aqua bidest. und 450 ml Aqua dest. Saponin: Detergenz (Sigma-Aldrich Chemie). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid (Merck), GOS: Ziegennullserum (Sigma-Aldrich Chemie). Primärantikörper GFAP 2A5 ab4648 (Abcam). Die verwendete Verdünnung des Primärantikörpers lag bei 1:50. Biotin konjugierter Zweitantikörper goat anti mouse IgG (Vector # BA9200, Vector Laboratories). Avidin-Komplex (Vectastain ABC Kit # PK 4000, 1:50, Vector Laboratories). DAB: Diaminobenzidin, Ansatz: 10 mg DAB (Merck) in 15 ml PBS gelöst. RT: Raumtemperatur.

## 2.3 Stereologische Auswertungen

### 2.3.1 Einführung in die *design-based* Stereologie

Der Begriff *design-based* Stereologie bezeichnet eine Anzahl mathematischer Methoden zur quantitativen Bestimmung von Variablen (z. B. Zellzahl, Zellgröße, Volumina, Mikrogefäßlängendichte) in einem Referenzraum (z. B. einer Kleinhirnhälfte) (Glaser et al., 2006). *Design-based* bedeutet eine - im Gegensatz zur *model-based* Methodik – Annahmefreie, den Gesetzen von Mathematik und Statistik entsprechende Methode. Nach heutigem Maßstab gilt die *design-based* Stereologie als *state of the art* im Bereich der quantitativen Histologie (vgl. z. B. Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006).

Das Prinzip der *design-based* Stereologie zur Bestimmung von Mikrogefäßlängendichten in einem Organ oder einer Hirnregion lässt sich wie folgt erklären: In einem definierten Raum (z. B. einer menschlichen Kleinhirnhälfte mit den dort enthaltenen Mikrogefäßen, die sich im Verlauf dreidimensional, ähnlich wie ein Röhrensystem, durch das Gewebe ziehen) soll die Dichte an Mikrogefäßen bestimmt werden. Nun könnte das gesamte Volumen der Kleinhirnhälften in kleine Scheiben geschnitten und auf allen Scheiben Mikrogefäßanschnitte gezählt werden. Dies wäre allerdings viel zu langwierig und zeitaufwändig. Eine bessere Möglichkeit wäre, Mikrogefäße nur in bestimmten Scheiben zu zählen und die Gesamtzahl an Anschnitten der Mikrogefäße auf das gesamte Volumen (Grundfläche des Kleinhirns multipliziert mit der Tiefe) hochzurechnen. Dieses Verfahren, gerade wenn die Scheiben nicht zufällig ausgewählt werden, birgt jedoch die Gefahr, „biased“ zu arbeiten, d. h. systematischen Fehlern zu unterliegen (in diesem Beispiel entweder zu viele Anschnitte von Mikrogefäßen und in der Folge bei der Hochrechnung ein zu hohes Gesamtergebnis oder auch das Gegenteil). Daher ist es für eine valide Aussage notwendig, die Auswahl der Scheiben, in denen Mikrogefäßanschnitte gezählt werden, systematisch zu wählen. Auf die Stereologie übertragen bedeutet dies, eine sogenannte *systematically and randomly sampled* (SRS) Serie von Gehirnschnitten und mikroskopischen Gesichtsfeldern zu erstellen (Gundersen, 1986; Gundersen und Jensen, 1987; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006). Hierbei ist z. B. der Abstand der Gehirnschnitte zueinander streng systematisch (wie in Tabelle 2.3 gezeigt). Bei Fallnummer 10/67 wurde z. B. nur jeder 72. Schnitt analysiert. Durch diese Reduktion der zu analysierenden Schnitte wird der Zählaufwand für die Analyse erheblich reduziert (bei Fallnummer 10/67 z. B. um den Faktor 72). Jedoch ist auch diese Reduktion noch nicht umfassend genug, und so werden pro Schnitt nur einige, ebenfalls nach SRS Kriterien ausgewählte mikroskopische Gesichtsfelder analysiert. Damit die Orte dieser Gesichtsfelder sowohl systematisch als auch zufällig gewählt werden, legt man ein Gitter mit definierten Kantenlängen in X- und Y- Richtung

zufällig über den untersuchten Schnitt. An den Kreuzungspunkten im Gitter befinden sich dann die zu analysierenden Gesichtsfelder.

Die Bestimmung der Mikrogefäßlängendichte selber erfolgte mit Hilfe der *Space Balls* Methode (Calhoun und Mouton, 2001; Mouton et al., 2002; Schmitz und Hof, 2005). Konkret wurde in der Mitte von jedem Gesichtsfeld ein virtueller *Hemi-Space Ball* generiert (Details in Kapitel 2.3.5), der als virtuelle Halbkugel mit einem Sicherheitsabstand zur oberen Schnittoberfläche in den zu untersuchenden Raum gelegt wurde, so dass die abgeschnittene Seite der Halbkugel nach unten zu liegen kam. In der hier vorliegenden Arbeit betrug der Sicherheitsabstand (= *guard zone*) 3  $\mu\text{m}$  (siehe Tabellen 2.7 und 2.8). Diese *guard zone* war notwendig um Unebenheiten der Gewebeoberfläche auszugleichen. Betrachtet man den *Hemi-Space Ball* in einer dünnen Ebene parallel zur Schnittoberfläche, so ist ein Kreis zu sehen, dessen Radius mit zunehmender Entfernung von der oberen Schnittoberfläche zunimmt (bis zum Radius des *Hemi-Space Balls* selber). Durch Verschieben der Fokusebene innerhalb des Schnitts ändert sich auch der Radius des Kreises, der einen Anschnitt des *Hemi-Space Balls* in der untersuchten Fokusebene darstellt (siehe Abbildung 2.2). Gezählt wurden dann alle Schnittpunkte des Kreises in allen Fokusebenen mit der virtuellen Mittellinie derjenigen Mikrogefäße, die im analysierten Gesichtsfeld angetroffen wurden (Calhoun und Mouton, 2001; Mouton et al., 2002; Schmitz und Hof, 2005). Anschließend wurde die Mikrogefäßdichte in der untersuchten Kleinhirnhälfte hochgerechnet (Details in Kapitel 2.3.5), wobei hierzu auch das Volumen der untersuchten Kleinhirnhälfte bestimmt werden musste (Details in Kapitel 2.3.6).

Die Tabellen 2.7 bis 2.10 zeigen die stereologischen Details der Messungen der Mikrogefäßlängendichte bei den n=9 SIDS-Fällen, den n=14 Kontrollen und den n=9 gematchten Kontrollen. Durchschnittlich wurden 1194 Schnittpunkte zwischen den *Hemi-Space Balls* und den Mikrogefäßen pro Kleinhirnhemisphäre gezählt. In den Tabellen 2.8 und 2.9 sind die Schnittpunkte zwischen den *Hemi-Space Balls* und den Mikrogefäßen je Kleinhirnschicht dargestellt.

**Tabelle 2.7** Details der stereologischen Bestimmung der Mikrogefäßlängendichte im Kleinhirn der n=9 SIDS-Fälle, die mit Hilfe der *Space Balls* Methode (Calhoun und Mouton, 2001; Mouton et al., 2002; Schmitz und Hof, 2005) ermittelt wurden.  $\Sigma S$ : Anzahl der untersuchten Schnitte. G: Kantenlängen des Gitters in X und Y Richtung, das zur *systematically and randomly sampled* (SRS) Positionsbestimmung der *Hemi-Space Balls* verwendet wurde.  $ssf^1$ : Kehrwert der *section sampling fraction*. T: mittlere gemessene Schnittdicke nach histologischer Aufarbeitung. gz: *guard zone* (Sicherheitsabstand der *Hemi-Space Balls* zur oberen Schnittoberfläche). r: Radius der *Hemi-Space Balls*. MW: Mittelwert.

Fallnummer	$\Sigma S$	G [ $\mu m$ ]	$ssf^1$	T [ $\mu m$ ]	gz [ $\mu m$ ]	r [ $\mu m$ ]
10/67	5	1300	72	31,5	3	25
10/50	5	1300	87	41,6	3	25
10/68	5	1600	72	34,7	3	25
10/54	5	1400	93	40,6	3	25
10/55	5	1700	72	42,5	3	25
10/47	5	1900	72	36,8	3	25
10/73	5	1900	72	37,5	3	25
10/78	5	1900	96	33,6	3	25
10/88	6	2000	72	37,4	3	25
MW	5,1	1666,7	78,7	37,4	3	25

**Tabelle 2.8** Details der stereologischen Bestimmung der Mikrogefäßlängendichte im Kleinhirn der n=14 Kontrollen (inkl. der n=9 gematchten Kontrollen, gekennzeichnet mit \*), die mit Hilfe der *Space Balls* Methode (Calhoun und Mouton, 2001; Mouton et al., 2002; Schmitz und Hof, 2005) ermittelt wurden.  $\Sigma S$ : Anzahl der untersuchten Schnitte. G: Kantenlängen des Gitters in X und Y Richtung, das zur *systematically and randomly sampled* (SRS) Positionsbestimmung der *Hemi-Space Balls* verwendet wurde.  $ssf^1$ : Kehrwert der *section sampling fraction*. T: mittlere gemessene Schnittdicke nach histologischer Aufarbeitung. gz: *guard zone* (Sicherheitsabstand der *Hemi-Space Balls* zur oberen Schnittoberfläche). r: Radius der *Hemi-Space Balls*. MW: Mittelwert aller n=14 Kontrollen, MW\*: Mittelwert der n=9 gematchten Kontrollen.

Fallnummer	$\Sigma S$	G [ $\mu m$ ]	$ssf^1$	T [ $\mu m$ ]	gz [ $\mu m$ ]	r [ $\mu m$ ]
10/46	5	1000	60	29,6	3	25
10/76	5	1100	54	29,6	3	25
10/70	5	1100	78	31,1	3	25
10/79*	5	1200	72	32,6	3	25
10/71*	6	1500	72	32,9	3	25
10/80*	5	1400	60	32,4	3	25
10/99*	5	1600	72	40,2	3	25
10/92*	5	1500	96	42,4	3	25
10/64	5	1800	96	39,2	3	25
10/84*	5	1500	72	40,4	3	25
10/45*	5	1700	96	38,4	3	25
10/58*	5	1900	72	40,7	3	25
10/65*	5	1900	72	38,7	3	25
10/77	5	2000	72	32,0	3	25
MW	5,1	1514	74,6	35,7	3	25
MW*	5,1	1578	76,0	37,6	3	25

**Tabelle 2.9** Anzahl der *Hemi-Space Balls* ( $\Sigma$  HSB) und gezählte Schnittpunkte zwischen den *Hemi-Space Balls* und der virtuellen Mittellinie von Mikrogefäßen ( $\Sigma$  is; „intersections“) zur Bestimmung der schichtspezifischen Mikrogefäßlängendichte in den untersuchten Kleinhirnhälften der n=9 SIDS-Fälle. äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz. MW: Mittelwert.

Fallnummer	äGZS		MS		PZS		iGZS		WS	
	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is
10/67	212	113	197	176	154	201	498	504	350	294
10/50	176	90	262	179	127	164	464	452	299	219
10/68	171	88	359	243	140	181	520	477	307	278
10/54	136	54	404	312	142	168	494	472	300	181
10/55	108	49	471	345	98	105	539	480	217	170
10/47	91	58	476	413	106	110	504	448	239	149
10/73	75	33	553	404	78	78	520	499	224	147
10/78	104	63	500	488	86	96	466	561	250	150
10/88	111	74	474	399	85	87	450	421	210	124
MW	132	69	411	329	113	132	495	479	266	190

**Tabelle 2.10** Anzahl der *Hemi-Space Balls* ( $\Sigma$  HSB) und gezählte Schnittpunkte zwischen den *Hemi-Space Balls* und der virtuellen Mittellinie von Mikrogefäßen ( $\Sigma$  is; „intersections“) zur Bestimmung der schichtspezifischen Mikrogefäßlängendichte in den untersuchten Kleinhirnhälften der n=14 Kontrollen (inkl. der n=9 gematchten Kontrollen, gekennzeichnet mit \*). äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz. MW: Mittelwert aller n=14 Kontrollen; MW\*: Mittelwert der n=9 gematchten Kontrollen. Bei Fallnummer 10/64 konnten nur vier Kleinhirnschnitte untersucht werden. Dementsprechend wurden die Werte von Fallnummer 10/64 nicht bei der Berechnung der Mittelwerte berücksichtigt.

Fallnummer	äGZS		MS		PZS		iGZS		WS	
	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is	$\Sigma$ HSB	$\Sigma$ is
10/46	125	95	170	148	132	237	517	603	429	367
10/76	143	67	127	128	123	237	538	654	407	470
10/70	169	72	178	135	136	157	503	538	376	367
10/79*	211	96	257	158	99	108	563	474	328	240
10/71*	179	105	330	284	115	178	462	484	298	261
10/80*	181	67	198	109	107	116	550	517	340	266
10/99*	152	87	317	234	153	183	447	368	321	256
10/92*	123	79	494	366	109	121	458	381	283	189
10/64	64	34	313	266	69	84	364	411	177	100
10/84*	52	23	556	432	102	112	410	359	241	165
10/45*	77	30	466	349	96	123	462	496	230	141
10/58*	94	60	482	413	100	98	438	421	252	137
10/65*	54	22	531	420	124	115	425	394	275	134
10/77	73	59	460	443	128	161	449	461	238	204
MW	121	64	349	278	114	145	470	469	300	236
MW*	125	63	403	307	112	128	468	433	285	199

## 2.3.2 Aufbau des verwendeten Stereologiesystems

Das verwendete Stereologiesystem bestand aus den folgenden Komponenten:

1. Lichtmikroskop, Zeiss Axioskop (Zeiss, Wetzlar, Deutschland).
2. Feinkalibrierter Objektivrevolver mit folgenden Objektiven von Zeiss (Bedeutung der Zahlen: die erste Zahl zeigt den Abbildungsmaßstab, die zweite Zahl die numerische Apertur.  $\infty$  bedeutet die Korrektur des Objektivs auf unendlich, die Zahl 0,17 die Korrektur des Objektivs auf die Dicke des Deckglases von 0,17 mm).
  - I. Plan-NEOFLUAR 1,25x / 0,035;  $\infty$  / -
  - II. Plan-NEOFLUAR 2,5x / 0,075;  $\infty$  / -
  - III. Plan-NEOFLUAR 10x / 0,30;  $\infty$  / 0,17
  - IV. Plan-NEOFLUAR 20x / 0,50;  $\infty$  / 0,17
  - V. Plan-NEOFLUAR 40x / 0,75;  $\infty$  / 0,17
3. Motorisierter Objektträgertisch (Ludl, Hawthorne, NY, USA).
4. Messtaster zur Bestimmung der Schnittdicke (MT 1271, Fa. Dr. Johannes Heidenhain, Traunreut, Deutschland).
5. MAC6000 XYZ Stage Controller mit 3 Achsen (X,Y,Z) Joystick und PC Interface (Ludl).
6. Farbkamera  $\frac{3}{4}$  CCD Chip, 1,92 MP, 1600x1200 Pixel, 36-bit Color (MBF Bioscience, Williston, VT, USA).
7. PC (3,33 GHz Intel Core 2 Duo, 8GB RAM, 1TB HD, Windows 7 Professional 64bit)
8. Software *Stereo Investigator* 10 (MBF Bioscience).
9. 24 Zoll-Monitor EIZO FlexScan S2433W (EIZO Corporation, Hakusan, Ishikawa, Japan).

## 2.3.3 Verblindete Datenerhebung

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen erfolgten blind, d.h., der Untersucher (J. Müller-Starck) wusste bis zum Abschluss aller Messungen nicht, ob es sich bei einer untersuchten Kleinhirnhälfte um einen SIDS-Fall oder eine Kontrolle handelte.

## 2.3.4. Untersuchte Kleinhirnschichten

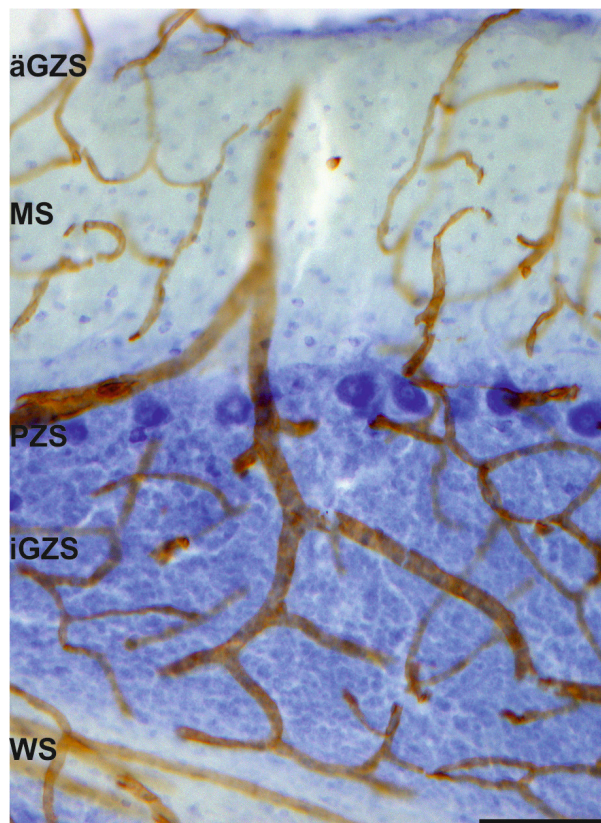
Das menschliche Kleinhirn weist, zumindest während des ersten Lebensjahres, insgesamt fünf verschiedene Schichten auf. Die Verteilung der Kleinhirnschichten von außen nach innen gestaltet sich wie folgt (Squire et al., 2008; siehe auch Abbildung 2.1):

1. Äußere Granularzellschicht: zellreiche, homogene Schicht, die im Laufe der Kleinhirnentwicklung im Verlauf des zweiten Lebensjahres verschwindet und die Vorläufer der Granularzellen bildet (vgl. Kiessling et al., 2013a).



2. Molekularschicht: zellarme, helle Schicht; enthält Korbzellen, Sternzellen, die Axone der Granularzellen sowie die Dendriten der Purkinjezellen.
3. Purkinjezellschicht: einreihige Zellschicht mit großen Zellkernen, auf Grund der Größe nicht mit den Zellkernen der Granularzellschicht zu verwechseln.
4. Innere Granularzellschicht: zellreiche homogene Schicht, auf Grund der unterschiedlichen Zellgrößen gut abgrenzbar gegen die darüber liegende Purkinjezellschicht und die darunterliegende weiße Substanz. In dieser Schicht kommen neben den dicht gepackten Granularzellen noch wenige homogen angefärbte Golgizellen sowie kleinere, in der Cresylviolett-Färbung etwas dunkler gefärbte Astrozyten vor.
5. Weiße Substanz: enthält im Wesentlichen Axone und kaum Zellkerne. In der weißen Substanz liegen auch Kernansammlungen wie z. B. der Nucleus dentatus.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Mikrogefäßlängendichten und das Volumen aller fünf Kleinhirnschichten bestimmt. Die Unterscheidung der Schichten erfolgte durch mikroskopische Inspektion mit Hilfe der oben beschriebenen Kriterien.



**Abbildung 2.1:** Übersicht über alle fünf Schichten des menschlichen Kleinhirns im ersten Lebensjahr (Fallnummer 10/88; Alter: 10 Monate) nach immunhistochemischem Nachweis von Kollagen IV und Gegenfärbung mit Cresylviolett. äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS:

Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz. Der Meßbalken entspricht 100 µm.

### 2.3.5. Bestimmung der Mikrogefäßlängendichte in einer Kleinhirnschicht mit der *Space Balls* Methode

Für jede Kleinhirnhälfte wurde eine SRS-Serie von fünf Schnitten (bzw. sechs Schnitten bei den Fallnummern 10/71 und 10/88) stereologisch ausgewertet (siehe Kapitel 2.3.1).

In einem ersten Schritt wurden die Schnitte unter dem 1,25x Objektiv gemustert und mit Hilfe der *Stereo Investigator* Software (MBF Bioscience) das Kleinhirn grob umrandet. Die Umrandung funktionierte so, dass das mit der Kamera aufgenommene Bild des Präparates (hier: des Kleinhirns) auf dem Bildschirm des Stereologiesystems dargestellt wurde. Nun wurde eine Linie exakt um die Außenkontur des untersuchten Kleinhirnschnittes gezogen. Diese Linie war virtuell, d.h. die Software ordnete den X- und Y-Koordinaten des Bildes Linien zu, und der Mikroskoptisch war in der Lage, jede gewünschte Position im untersuchten Kleinhirnschnitt anzufahren. Nach der Umrandung des Kleinhirnschnittes wurde die Kontur geschlossen, so dass eine Fläche entstand. Die *Stereo Investigator* Software ermittelte automatisch die Fläche innerhalb der geschlossenen Kontur. Nachdem alle 5 (bzw. 6) Schnitte der Schnittserie vermessen waren, konnte durch Addition der Flächen die Gesamtfläche ( $\sum A_s$ ) bestimmt werden.

Nun wurde durch die folgende Formel eine Gittergröße  $G$  in  $X$  und  $Y$  berechnet (quadratisches Gitter,  $X=Y$ ), die es später ermöglichte, auf allen Schnitten einer untersuchten Kleinhirnhälfte insgesamt ca. 1500 mikroskopische Gesichtsfelder anzufahren, wobei innerhalb eines Schnittes die Gesichtsfelder in regelmäßigem Abstand  $X$  und  $Y$  zueinander angeordnet werden konnten:

$$G(X, Y) = \sqrt{\frac{\sum A_s}{1500}}$$

Der Wert für  $G$  war für jede untersuchte Kleinhirnhälfte anders, abhängig von der Größe der Kleinhirnhälften, und wurde jeweils zu den in den Tabellen 2.7 und 2.8 gelisteten Werten abgerundet.

In einem zweiten Schritt legte die *Stereo Investigator* Software virtuell über jeden untersuchten Schnitt ein Gitter mit Kantenlänge  $G$  in  $X$ - und  $Y$ -Richtung, wobei an jedem Kreuzungspunkt im Gitter ein mikroskopisches Gesichtsfeld positioniert wurde. Die Position des Gitters relativ zum untersuchten Schnitt war streng zufällig; der Abstand der Gesichtsfelder zueinander jedoch durch das Gitter festgelegt. Dementsprechend erfolgte die Auswahl der untersuchten Gesichtsfelder wiederum nach SRS Kriterien.

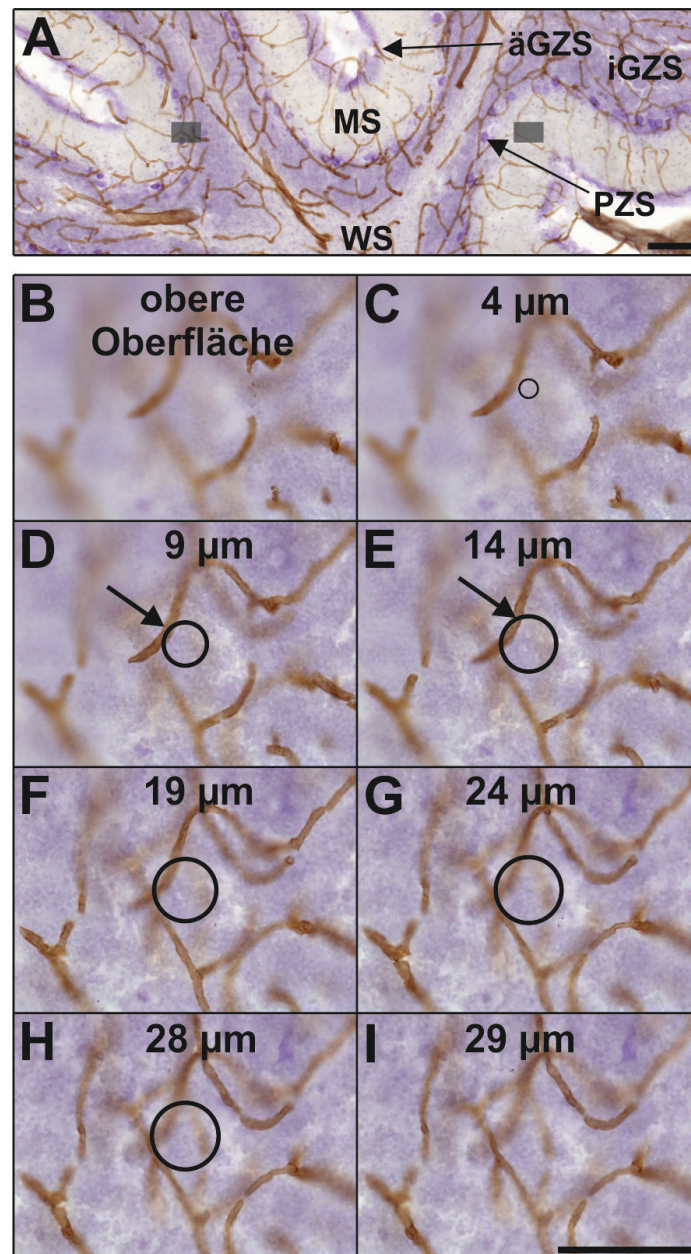
An jedem 10. Kreuzungspunkt im Gitter wurde die Schnittdicke optisch vermessen (die Schnitte waren vor der histologischen Aufarbeitung 100 µm dick, zeigten aber durch die histologische Aufarbeitung eine Schrumpfung entlang der Schnittdicke, d.h. in Z-Richtung). Dies erfolgte mit dem 40x Objektiv durch Anfahren der oberen und unteren Oberfläche des untersuchten Kleinhirnschnittes. Aus den Informationen des Messtasters ermittelte die *Stereo Investigator* Software automatisch die Schnittdicke. Aus allen Messungen pro untersuchter Kleinhirnhälfte wurde die mittlere Schnittdicke pro Kleinhirnhälfte nach histologischer Aufarbeitung errechnet.

Zur Bestimmung der Mikrogefäßlängendichte in einer Kleinhirnschicht wurde in der Mitte von jedem Gesichtsfeld im o.g. Gitter durch die *Stereo Investigator* Software ein *Hemi-Space Ball* innerhalb des Kleinhirnschnittes erzeugt (Calhoun und Mouton, 2001; Mouton et al., 2002; Schmitz und Hof, 2005). Dabei wurde zur Oberseite des Schnittes ein Sicherheitsabstand von 3 µm eingehalten um Unebenheiten der Gewebeoberfläche auszugleichen. Die Erzeugung von *Hemi-Space Balls* ist in Abbildung 2.2 erläutert; die mikroskopischen Analysen erfolgten mit dem 40x Objektiv. Nachdem durch Inspektion des untersuchten Schnittes ermittelt war, in welcher Kleinhirnschicht sich der *Hemi-Space Ball* befand, wurden die Schnittpunkte der virtuellen Mittellinie von Mikrogefäßen mit der Oberfläche des *Hemi-Space Balls* gezählt (siehe Abbildung 2.2). Als „Mikrogefäße“ wurden alle Gefäße aufgefasst, deren Durchmesser nicht mehr als 9 µm entsprach (gleiche Vorgehensweise wie bei Kreczmanski et al., 2005). Dabei konnte der Durchmesser einzelner Gefäße während der Untersuchungen schnell mit der „Fast measure line“ Funktion der *Stereo Investigator* Software bestimmt werden.

Die Mikrogefäßlängendichte in einer untersuchten Kleinhirnschicht ergab sich dann aus folgender Formel (Kreczmanski et al., 2005; adaptiert aus Calhoun und Mouton, 2001):

$$MGLD = \frac{2 \cdot \sum is \cdot (G_x \cdot G_y \cdot t)}{2 \cdot \pi \cdot r^2} \cdot \frac{1}{V}$$

Dabei war *MGLD* die Mikrogefäßlängendichte,  $\sum is$  die Gesamtzahl von Schnittpunkten von Mikrogefäßen mit der Oberfläche der *Hemi-Space Balls*,  $G_x$  und  $G_y$  der Abstand der untersuchten mikroskopischen Gesichtsfelder in X- und Y-Richtung,  $t$  die mittlere Schnittdicke,  $r$  der Radius der *Hemi-Space Balls* und  $V$  das Volumen der untersuchten Kleinhirnschicht (die Bestimmung der Volumen der untersuchten Kleinhirnschichten wird im nächsten Kapitel beschrieben).



**Abbildung 2.2:** Bestimmung von Mikrogefäßlängendichten im menschlichen Kleinhirn mit *Hemi-Space Balls* (Calhoun und Mouton, 2001; Mouton et al., 2002) nach immunhistochemischem Nachweis von Kollagen IV und Gegenfärbung mit Cresylviolett. (A) Übersicht aus einem Kleinhirnschnitt (Fallnummer 10/54; Alter: 6 Monate) bei niedrigem Abbildungsmaßstab; die unterschiedlichen Schichten des Kleinhirns sind markiert (äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz). Die beiden grauen Felder repräsentieren exemplarisch die Lage von zwei Gesichtsfeldern, an denen die Mikrogefäßlängendichte bestimmt wurde. (B-I) repräsentatives mikroskopisches Gesichtsfeld bei hohem Abbildungsmaßstab in 8 unterschiedlichen Fokustiefen; die Zahlen geben den Abstand der Fokusebene zur oberen Oberfläche des Schnittes an. Der *Hemi-Space Ball* hatte einen Durchmesser von 25 µm; seine Basis wurde in einer Tiefe von 28 µm unterhalb der oberen Oberfläche im Schnitt platziert. Dementsprechend war der *Hemi-Space Ball* in einer Tiefe von 3 µm bis 28 µm innerhalb des

Schnittes zu finden, mit unterschiedlichem Anschnittsradius an den gezeigten Fokustiefen (am kleinsten bei 4 µm, mit zunehmender Fokustiefe zunehmender Anschnittsradius; größter Radius [Basis] bei 28 µm; kein Anschnitt des *Hemi-Space Balls* mehr bei 29 µm Fokustiefe). In Fokustiefen von 9 µm und 14 µm wurden Schnittpunkte von Mikrogefäßen und dem *Hemi-Space Ball* gefunden (Pfeile). Der Meßbalken in **A** entspricht 100 µm, wie auch der Meßbalken in **I** (für **B-I**).

### 2.3.6. Bestimmung des Volumens einer Kleinhirnschicht mit der Cavalieri Methode

Wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, wurde jeder verwendete *Hemi-Space Ball* derjenigen Kleinhirnschicht zugeordnet, in der er sich befand (genauer: in der sich der Mittelpunkt der Basis des *Hemi-Space Balls* befand). Somit dienten die *Hemi-Space Balls* neben der Ermittlung der Kapillarlängendichten auch – mittels Punktzählverfahren – der Bestimmung des Volumens der untersuchten Kleinhirnschichten (Gundersen und Jensen, 1987; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006). Konkret ergab sich das Volumen einer untersuchten Kleinhirnschicht aus der folgenden Formel:

$$V = \sum M \cdot G_x \cdot G_y \cdot S$$

Dabei war  $V$  das Volumen der untersuchten Kleinhirnschicht,  $\sum M$  die Summe aller Mittelpunkte der Basis derjenigen *Hemi-Space Balls*, die in der untersuchten Kleinhirnschicht gefunden wurden,  $G_x$  und  $G_y$  der Abstand der untersuchten mikroskopischen Gesichtsfelder in X- und Y-Richtung, und  $S$  der Abstand zwischen den untersuchten Schnitten.

## 2.4 Statistische Analyse

Für jeden der  $n=23$  untersuchten Fälle wurden die folgenden Parameter bestimmt:

- Alter
- Körperlänge
- Körpergewicht
- Gehirngewicht
- Verhältnis Gehirngewicht zu Körpergewicht

Die nachfolgenden Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit gemessen:

- Volumen und Mikrogefäßlängendichte der äußeren Granularzellschicht
- Volumen und Mikrogefäßlängendichte der Molekularschicht
- Volumen und Mikrogefäßlängendichte der Purkinjezellschicht
- Volumen und Mikrogefäßlängendichte der inneren Granularzellschicht

- Volumen und Mikrogefäßlängendichte der weißen Substanz

Für die Volumina und die Mikrogefäßlängendichte aller Schichten wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet, und zwar getrennt für die drei untersuchten Gruppen (n=9 SIDS-Fälle, n=14 Kontrollen; n=9 gematchte Kontrollen). Des Weiteren wurde für die äußere Granularzellschicht eine quadratische Regressionsanalyse ( $y = B_0 + B_1 \cdot x + B_2 \cdot x^2$ ) nach der *least-squares-(ordinary) fitting*-Methode und für alle anderen Kleinhirnschichten eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Unterschiede in den Volumina der einzelnen Schichten des Kleinhirns sowie der Mikrogefäßlängendichten in diesen Schichten wurden mit Hilfe der *repeated measures* ANOVA untersucht, gefolgt von einem paarweisen Vergleich der Kleinhirnschichten mit der Bonferroni-Methode. Auch diese Analyse erfolgte jeweils getrennt für die drei untersuchten Gruppen (n=9 SIDS-Fälle, n=14 Kontrollen; n=9 gematchte Kontrollen). Schließlich wurden die Mittelwerte der n=9 SIDS-Fälle und der n=9 gematchten Kontrollen mit Hilfe des nichtparametrischen Wilcoxon *signed rank* Tests verglichen.

Da jeder Datensatz der n=9 SIDS-Fälle und der n=14 Kontrollen in drei unterschiedlichen Tests verwendet wurde, wurde ein Effekt als statistisch signifikant für alle Analysen betrachtet, wenn sein zugehöriger p-Wert nach der Bonferroni-Korrektur kleiner 0,0167 (0,05/3) war (Dunn, 1961). Alle Berechnungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

## 2.5 Fotografie

Die Abbildungen der hier vorliegenden Arbeit wurden an den folgenden Arbeitsstationen generiert:

- Abbildungen 2.1, 3.12, 3.13, 3.14, 3.26, 4.3 und 4.4: Arbeitsstation 1
- Abbildung 2.2: Arbeitsstation 2.

Diese Arbeitsstationen bestanden aus den folgenden Komponenten:

Arbeitsstation 1:

- Lichtmikroskop, Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
  - Objektiv Plan-NEOFLUAR 10x / 0,30 ; ∞/ 0,17 (Carl Zeiss)
  - Objektiv Plan-NEOFLUAR 40x / 0,75 ; ∞/ 0,17 (Carl Zeiss)
- Manueller Kreutztisch
- Hochauflösende Mikroskopie-Kamera Zeiss AxioCam HRc Rev.3 FireWire
- PC (3,16 GHz Core i5, 8GB RAM, 250 GB HD, Windows 7 Professional 32 bit)
- Software Zeiss Axiovision 4.8.2 (Carl Zeiss)

- Zwei baugleiche 19 Zoll Monitore EIZO FlexScan S1921 (EIZO Corporation)

#### Arbeitsstation 2:

- Lichtmikroskop, Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japan)
- Objektiv 1: Plan-Fluor 10x / 0,30;  $\infty$  / 0,17 (Nikon)
- Objektiv 2: Plan-Fluor 40x / 0,75;  $\infty$  / 0,17 (Nikon)
- Motorisierter Objektträgertisch (Ludl)
- LEP MAC6000 XYZ Stage Controller mit 3 Achsen (X,Y,Z) Joystick und PC Interface (Ludl)
- Farbkamera  $\frac{1}{2}$  CCD Chip, 1392x1040 Pixel, 36-bit Color (MBF Bioscience)
- PC (3,46 GHz Core i7, 16GB RAM, 2 TB HD, Windows 7 Professional 64 bit)
- Software Microlucida (Version 2.52; MBF Bioscience)
- 24 Zoll Monitor EIZO FlexScan S2433W (EIZO Corporation)

Die Montage und Beschriftung der Bilder erfolgte mit der Software Corel Draw X6 (Version 16.4.0.1280; Corel Corporation; Ottawa, Kanada). Dabei wurden die Originalfotos mit der Software Corel Photo-Paint X6 (Version 16.4.0.1280; Corel) in Bezug auf Helligkeit und Kontrast einander angeglichen, ohne die zytoarchitektonischen Details zu verändern.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Alter, Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=9 SIDS-Fälle und der n=14 Kontrollen

Die Tabellen 3.1 und 3.2 zeigen die folgenden Daten der untersuchten n=9 SIDS-Fälle und der n=14 Kontrollen: Alter in Monaten, Körperlänge in cm, Körpergewicht in kg, Gehirngewicht in kg und das Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht in %, sowie die entsprechenden Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte.

Der Mittelwert des Gehirngewichtes war mit 837 g bei den n=9 SIDS-Fällen und 783 g bei den n=14 Kontrollen nahezu identisch. Ausgehend von den n=14 Kontrollen als 100% differierten die Mittelwerte der übrigen Variablen zwischen den n=9 SIDS-Fällen und den n=14 Kontrollen bis auf das Alter, das eine höhere Abweichung von 20,6% aufwies, nur geringgradig um weniger als 9% (Körperlänge: 5,7%, Körpergewicht: 5,0%, Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht: 8,9%).

**Tabelle 3.1:** Fallnummer, Alter, Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=9 SIDS-Fälle. MW: Mittelwert, StAbw: Standardabweichung, SF: Standardfehler des Mittelwertes. Für die Fallnummern 10/47 und 10/50 lag kein Gehirngewicht vor.

Fallnummer	Alter [Monate]	Körperlänge [cm]	Körpergewicht [kg]	Gehirngewicht [kg]	Gehirngewicht / Körpergewicht [%]
10/67	2	57	4,7	0,600	12,8
10/50	3	56	6,0		
10/68	3	63	5,7	0,702	12,3
10/54	6	69	7,8	0,797	10,2
10/55	7	69	5,9	0,919	15,6
10/47	9	75	8,1		
10/73	10	72	6,0	0,959	16,0
10/78	10	77	9,4	0,918	9,8
10/88	10	72	6,7	0,963	14,4
MW	6,667	67,778	6,7	0,837	13,0
StAbw	3,317	7,530	1,5	0,141	2,5
SF	1,106	2,510	0,5	0,047	0,8



**Tabelle 3.2:** Fallnummer, Alter, Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=14 Kontrollen. MW: Mittelwert, StAbw: Standardabweichung, SF: Standardfehler des Mittelwertes. Bei den mit \* markierten Fallnummern handelt es sich um die n=9 gematchten Kontrollen. Für die Fallnummer 10/76 lag kein Gehirngewicht vor).

Fallnummer	Alter [Monate]	Körperlänge [cm]	Körpergewicht [kg]	Gehirngewicht [kg]	Gehirngewicht / Körpergewicht [%]
10/46	0,03	49	2,7	0,335	12,4
10/76	0,03	50	3,3		
10/70	0,83	54	4,3	0,540	12,6
10/79*	1,5	61	5,4	0,594	11,0
10/71*	3	63	5,5	0,721	13,1
10/80*	3	55	5,4	0,539	10,0
10/99*	4	64	6,6	0,826	12,5
10/92*	7	70	6,8	0,751	11,0
10/64	8	72	9,7	1,239	12,8
10/84*	9	75	7,8	0,911	11,7
10/45*	10	74	8,9	0,956	10,7
10/58*	10	65	5,5	0,836	15,2
10/65*	10	73	8,6	0,967	11,2
10/77	11	73	8,8	0,960	10,9
MW	5,528	64,143	6,379	0,783	11,9
StAbw	4,152	9,181	2,170	0,239	1,4
SF	1,110	2,454	0,580	0,064	0,4
MW*	7,643	66,667	6,722	0,789	11,8
StAbw*	3,340	6,764	1,411	0,152	1,6
SF*	1,113	2,255	0,470	0,051	0,5

## 3.2 Volumina der untersuchten Kleinhirnschichten

### 3.2.1 Tabellarische Übersicht über alle Ergebnisse

Die Tabellen 3.3 und 3.4 zeigen für alle untersuchten n=9 SIDS-Fälle und n=14 Kontrollen die ermittelten Volumina der äußeren Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, inneren Granularzellschicht und weißen Substanz in  $\text{cm}^3$  sowie die zugehörigen Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte.

Die Mittelwerte der Volumina unterschieden sich ausgehend von den n=14 Kontrollen als 100% gegenüber den n=9 SIDS-Fällen im Einzelnen wie folgt: in der äußeren Granularzellschicht zeigte sich ein Unterschied von 35,8%, in der Molekularschicht von 29,7%, in der Purkinjezellschicht von 13,1%, in der inneren Granularzellschicht von 28,7% und in der weißen Substanz von 11,6%. Die statistische Analyse dieser Daten ist in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben.

**Tabelle 3.3:** Volumina der verschiedenen Kleinhirnschichten der n=9 SIDS-Fälle. MW: Mittelwert, StAbw: Standardabweichung, SF: Standardfehler des Mittelwertes.

Fallnummer	Äußere Granular- zellschicht [ $\text{cm}^3$ ]	Molekular- schicht [ $\text{cm}^3$ ]	Purkinje- zellschicht [ $\text{cm}^3$ ]	Innere Granular- zellschicht [ $\text{cm}^3$ ]	Weißer Substanz [ $\text{cm}^3$ ]
10/67	2,580	2,397	1,874	6,060	4,259
10/50	2,588	3,852	1,867	6,822	4,396
10/68	3,152	6,617	2,581	9,585	5,659
10/54	2,479	7,364	2,588	9,005	5,468
10/55	2,247	9,801	2,039	11,216	4,515
10/47	2,365	12,372	2,755	13,100	6,212
10/73	1,949	14,374	2,027	13,516	5,822
10/78	3,604	17,328	2,980	16,150	8,664
10/88	3,197	13,651	2,448	12,960	6,048
MW	2,685	9,751	2,351	10,935	5,672
StAbw	0,527	5,065	0,409	3,335	1,342
SF	0,176	1,688	0,136	1,112	0,447

**Tabelle 3.4:** Volumina der verschiedenen Kleinhirnschichten der n=14 Kontrollen. MW: Mittelwert, StAbw: Standardabweichung, SF: Standardfehler des Mittelwertes. Bei den mit \* markierten Fallnummern handelt es sich um die n=9 gematchten Kontrollen.

Fallnummer	Äußere Granularzellschicht [cm <sup>3</sup> ]	Molekularschicht [cm <sup>3</sup> ]	Purkinjezellschicht [cm <sup>3</sup> ]	Innere Granularzellschicht [cm <sup>3</sup> ]	Weißer Substanz [cm <sup>3</sup> ]
10/46	0,750	1,020	0,792	3,102	2,574
10/76	0,934	0,830	0,804	3,515	2,659
10/70	1,595	1,680	1,284	4,747	3,549
10/79*	2,188	2,665	1,026	5,837	3,401
10/71*	2,900	5,346	1,863	7,484	4,828
10/80*	2,129	2,328	1,258	6,468	3,998
10/99*	2,802	5,843	2,820	8,239	5,917
10/92*	2,657	10,670	2,354	9,893	6,113
10/64	2,799	13,375	3,079	14,806	7,247
10/84*	0,842	9,007	1,652	6,642	3,904
10/45*	2,136	12,929	2,663	12,818	6,381
10/58*	2,443	12,528	2,599	11,384	6,550
10/65*	1,404	13,802	3,223	11,047	7,148
10/77	2,102	13,248	3,686	12,931	6,854
MW	1,977	7,519	2,079	8,494	5,080
StAbw	0,752	5,205	0,963	3,707	1,702
SF	0,201	1,391	0,257	0,991	0,455
MW*	2,167	8,346	2,162	8,868	5,360
StAbw*	0,670	4,442	0,749	2,499	1,352
SF*	0,223	1,481	0,250	0,833	0,451

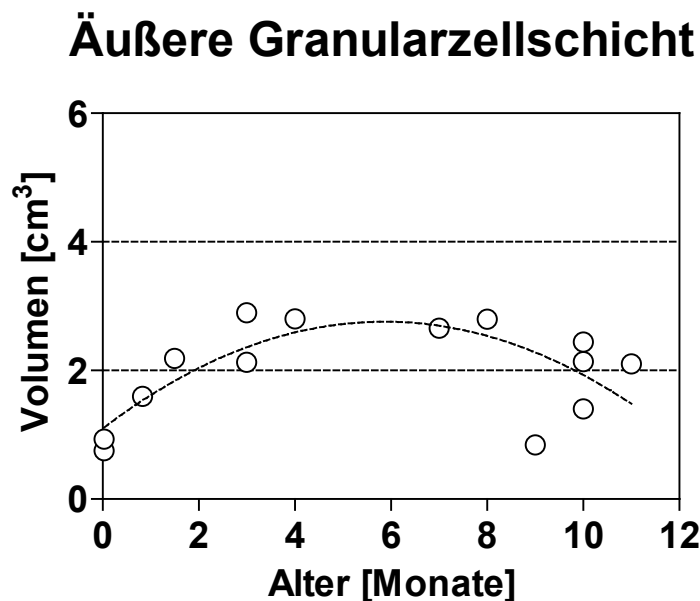
### 3.2.2 Statistische Analyse der Volumina der n=14 Kontrollen

In Abbildung 3.1 ist das Volumen der äußeren Granularzellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=14 Kontrollen gegenüber dem Alter dargestellt. Jeder der weißen Punkte repräsentiert eine Fallnummer. Die gestrichelte Linie zeigt das Ergebnis der nicht-linearen Regressionsanalyse (quadratische Regressionsanalyse;  $y = B_0 + B_1 \cdot x + B_2 \cdot x^2$ ) nach der *least-squares-(ordinary) fitting*-Methode.

In den Abbildungen 3.2 bis 3.5 sind die Volumina der anderen Kleinhirnschichten (Molekularschicht, Purkinjezellschicht, innere Granularzellschicht und weiße Substanz) der n=14 Kontrollen als Funktion des Alters dargestellt. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Ergebnisse der statistischen Analyse der gezeigten Daten mittels linearer Regression.

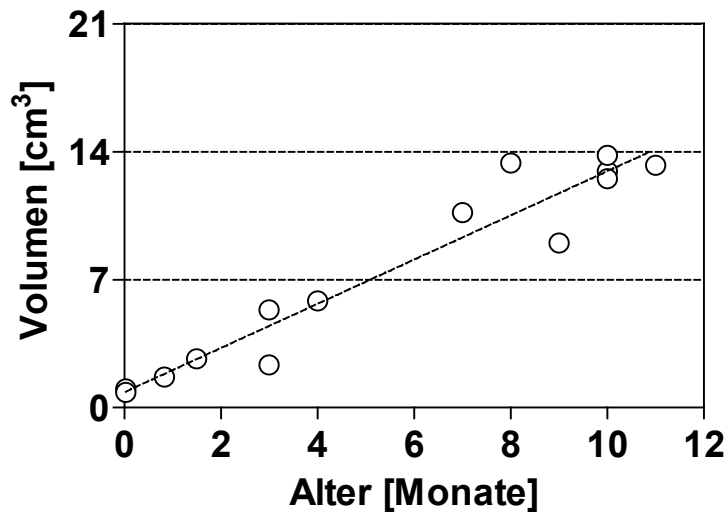
Für das Volumen der äußeren Granularzellschicht ergab die nicht-lineare Regressionsanalyse einen  $R^2$  Wert von 0,485. Das Volumen der äußeren Granularzellschicht nahm bei den untersuchten n=14 Kontrollen zunächst mit zunehmendem Lebensalter zu, ab dem 6. Lebensmonat allerdings wieder ab.

Für die übrigen Schichten des Kleinhirns fand sich eine statistisch signifikante (d.h.  $p < 0,05$ ) Zunahme des Volumens mit zunehmendem Lebensalter.



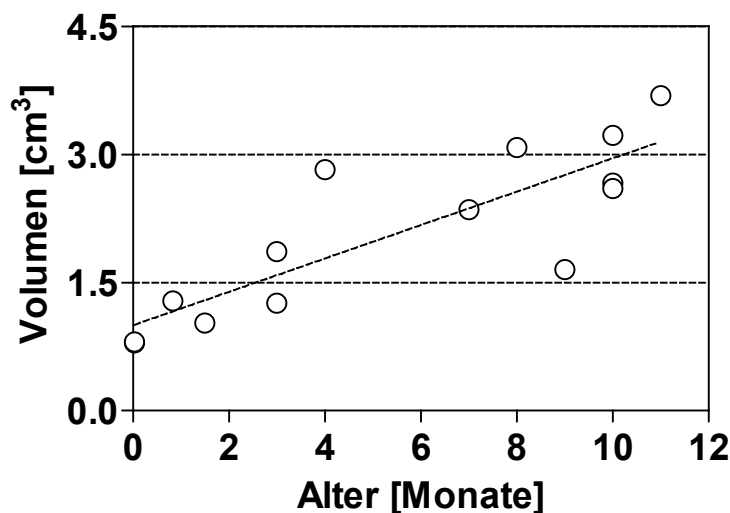
**Abbildung 3.1:** Volumen der äußeren Granularzellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=14 Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle; die gestrichelte Linie das Ergebnis der statistischen Analyse der gezeigten Daten mittels nicht-linearer Regression. Der  $R^2$  Wert betrug 0,485.

## Molekularschicht



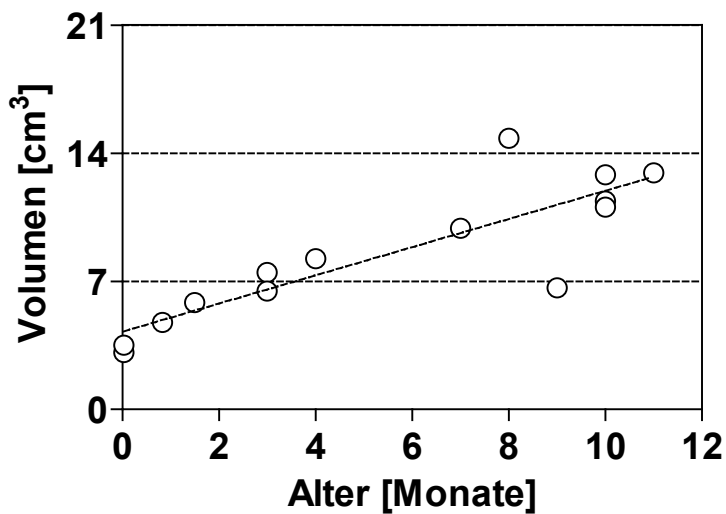
**Abbildung 3.2:** Volumen der Molekularschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=14$  Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle; die gestrichelte Linie das Ergebnis der statistischen Analyse der gezeigten Daten mittels linearer Regression. Die gezeigte Regressionsgerade hat einen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p<0,001$ ).

## Purkinjezellschicht



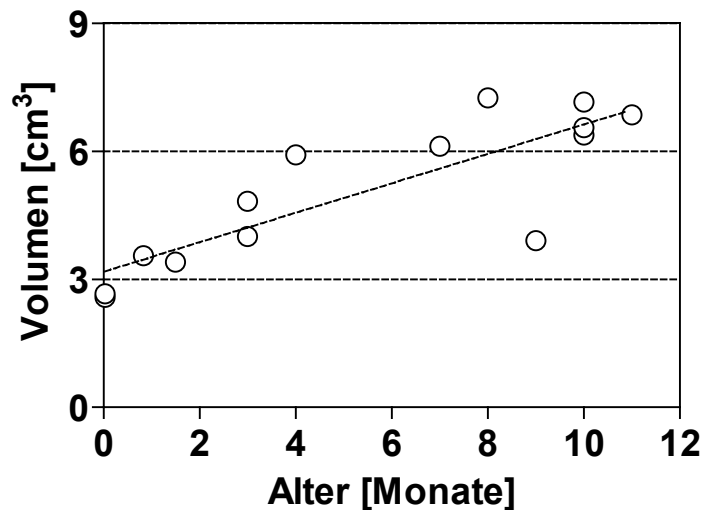
**Abbildung 3.3:** Volumen der Purkinjezellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=14$  Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle; die gestrichelte Linie das Ergebnis der statistischen Analyse der gezeigten Daten mittels linearer Regression. Die gezeigte Regressionsgerade hat einen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p<0,001$ ).

## Innere Granularzellschicht



**Abbildung 3.4:** Volumen der inneren Granularzellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=14 Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle; die gestrichelte Linie das Ergebnis der statistischen Analyse der gezeigten Daten mittels linearer Regression. Die gezeigte Regressionsgerade hat einen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p < 0,001$ ).

## Weißer Substanz

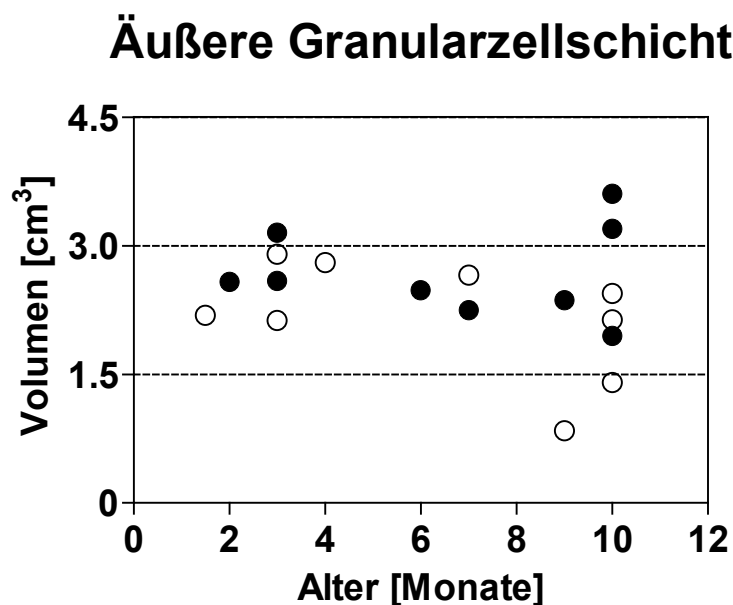


**Abbildung 3.5:** Volumen der weißen Substanz der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=14 Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle; die gestrichelte Linie das Ergebnis der statistischen Analyse der gezeigten Daten mittels linearer Regression. Die gezeigte Regressionsgerade hat einen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.3 Statistischer Vergleich der Volumina der n=9 SIDS-Fälle und der n=9 gematchten Kontrollen

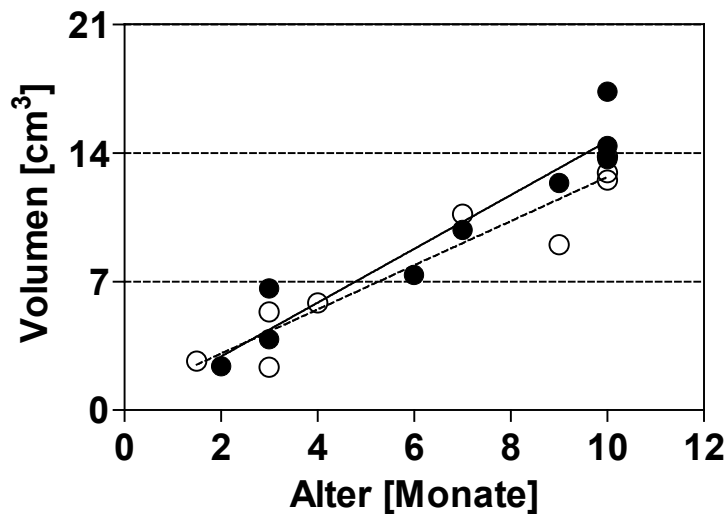
Die Abbildungen 3.6 bis 3.10 stellen die untersuchten Volumina der jeweiligen Kleinhirnschicht (äußere Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, innere Granularzellschicht und weiße Substanz) der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) den jeweiligen Werten der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) als Funktion des Alters gegenüber. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle, die Linien die Ergebnisse der statistischen Analyse mittels linearer Regression unter der Voraussetzung, dass statistisch signifikant von Null ( $p < 0,05$ ) verschiedene Regressionskoeffizienten gefunden wurden.

Es zeigte sich, dass die Volumina der einzelnen Kleinhirnschichten mit Ausnahme der äußeren Granularzellschicht mit zunehmendem Alter anstiegen.



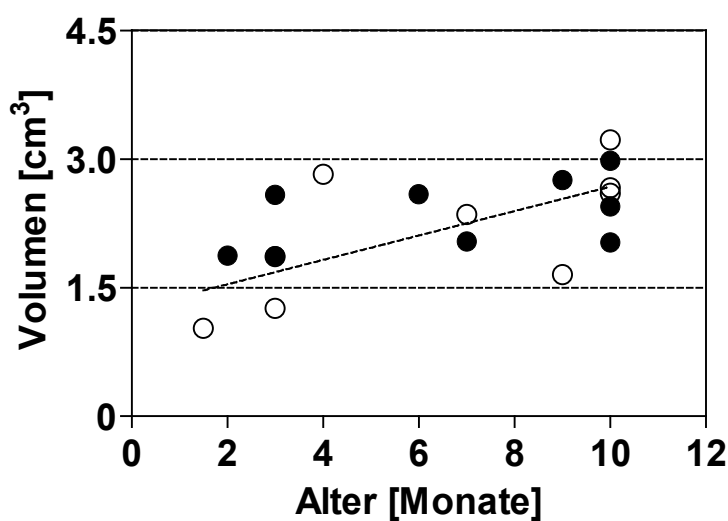
**Abbildung 3.6:** Volumen der äußeren Granularzellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=9 SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab weder bei den n=9 SIDS-Fällen ( $p=0,898$ ) noch bei den n=9 gematchten Kontrollen ( $p=0,194$ ) einen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten; dementsprechend sind in der Abbildung keine Regressionsgeraden gezeigt.

## Molekularschicht



**Abbildung 3.7:** Volumen der Molekularschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=9 SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab einen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten sowohl bei den SIDS-Fällen ( $p < 0,001$ ) als auch bei den Kontrollen ( $p < 0,001$ ); dementsprechend sind in der Abbildung Regressionsgeraden gezeigt. Die durchgezogene Linie entspricht der Regressionsgeraden der n=9 SIDS-Fälle, die gestrichelte Linie der der n=9 gematchten Kontrollen.

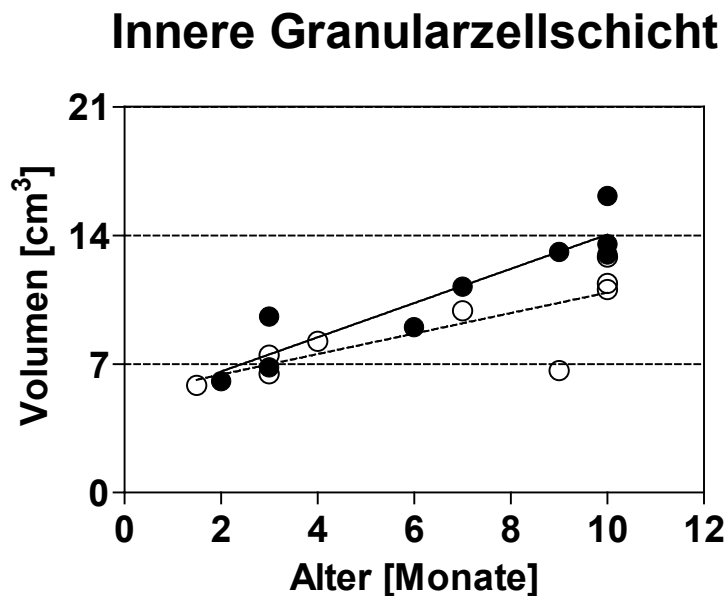
## Purkinjezellschicht



**Abbildung 3.8:** Volumen der Purkinjezellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=9 SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels

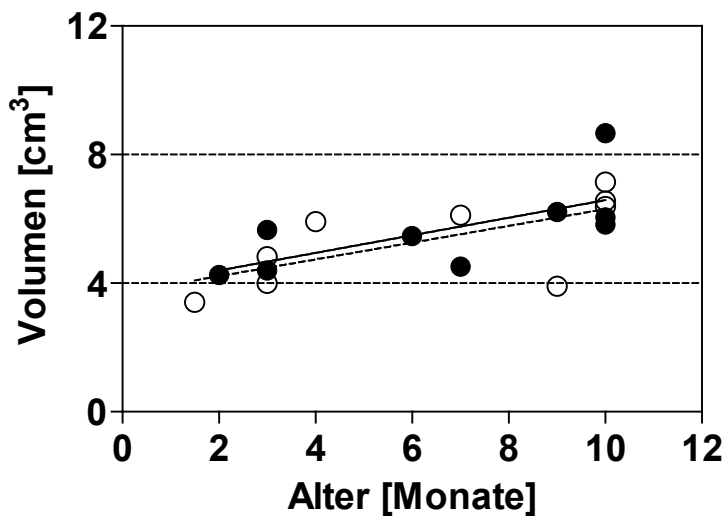


linearer Regression ergab keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten bei den SIDS-Fällen ( $p=0,194$ ). Bei den  $n=9$  gematchten Kontrollen ergab die statistische Analyse einen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p<0,050$ ); dementsprechend ist in der Abbildung eine gestrichelte Regressionsgerade der  $n=9$  gematchten Kontrollen gezeigt.



**Abbildung 3.9:** Volumen der inneren Granularzellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=9$  SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den  $n=9$  gematchten Kontrollen (weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab einen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten sowohl bei den SIDS-Fällen ( $p<0,001$ ) als auch bei den Kontrollen ( $p=0,012$ ); dementsprechend sind in der Abbildung Regressionsgeraden gezeigt. Die durchgezogene Linie entspricht der Regressionsgeraden der  $n=9$  SIDS-Fälle, die gestrichelte Linie der  $n=9$  gematchten Kontrollen.

## Weißer Substanz

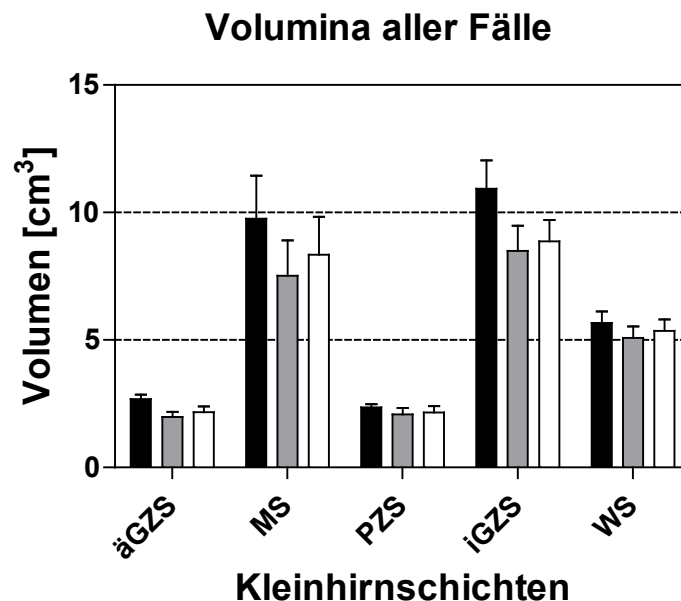


**Abbildung 3.10:** Volumen der weißen Substanz der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=9$  SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den  $n=9$  gematchten Kontrollen (weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab einen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten sowohl bei den SIDS-Fällen ( $p=0,046$ ) als auch bei den Kontrollen ( $p=0,045$ ); dementsprechend sind in der Abbildung Regressionsgeraden gezeigt. Die durchgezogene Linie entspricht der Regressionsgeraden der  $n=9$  SIDS-Fälle, die gestrichelte Linie der  $n=9$  gematchten Kontrollen.

In Abbildung 3.11 sind die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Volumina der fünf Kleinhirnschichten der  $n=9$  SIDS-Fälle (schwarze Balken), der  $n=14$  Kontrollen (graue Balken) und der  $n=9$  gematchten Kontrollen (weiße Balken) grafisch zusammengefasst. Die *repeated measures* ANOVA und der paarweise Vergleich mit der Bonferroni-Methode zeigten im Wesentlichen, dass die äußere Granularzellschicht (äGZS) und die Purkinjezellschicht (PZS) bei allen drei Gruppen statistisch signifikant ( $p<0,016$ ) kleiner waren als die Molekularschicht (MS) und die innere Granularzellschicht (iGZS) (alle Ergebnisse der statistischen Analyse in Tabelle 3.5). Das mittlere Volumen der weißen Substanz war größer als die mittlere Volumina von äGZS und PZS, aber kleiner als die mittleren Volumina von MS und iGZS (mit teilweise statistisch signifikanten [ $p<0,016$ ] Unterschieden).

Der Vergleich der Mittelwerte der  $n=9$  SIDS-Fälle und der  $n=9$  gematchten Kontrollen mit Hilfe des nichtparametrischen Wilcoxon „signed rank“ Tests ergab bis auf die innere Granularzellschicht keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (äußere Granularzellschicht:  $p=0,203$ ; Molekularschicht:  $p=0,203$ ; Purkinjezellschicht:

p=0,496; weiße Substanz: p=0,570). Das mittlere Volumen der inneren Granularzellschicht war bei den n=9 gematchten Kontrollen statistisch signifikant kleiner (p=0,012) als bei den SIDS-Fällen.



**Abbildung 3.11:** Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Volumina in den fünf Kleinhirnschichten der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Balken), der n=14 Kontrollen (graue Balken) und der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Balken). äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz.

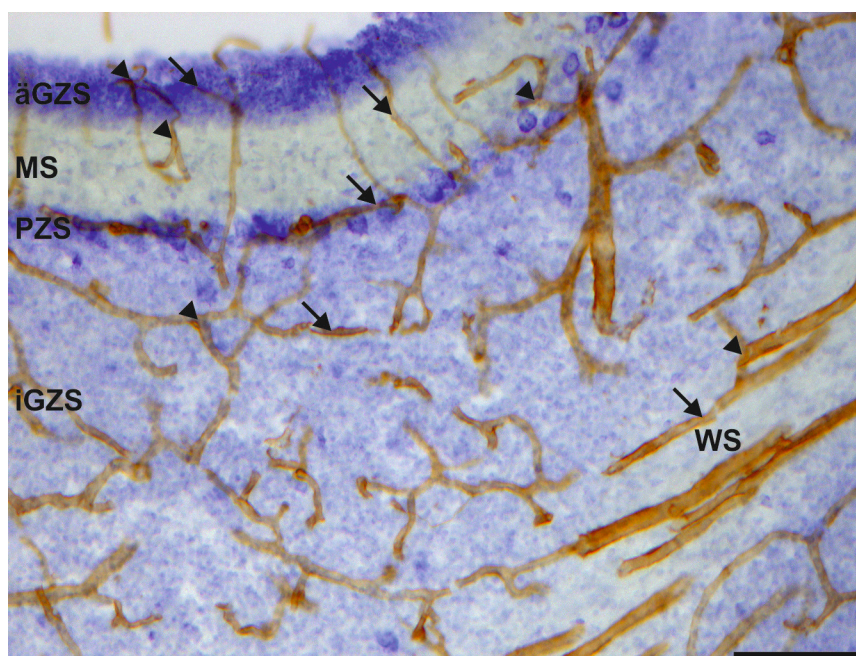
**Tabelle 3.5:** Ergebnisse der *repeated measures* ANOVA und des paarweisen Vergleichs mit der Bonferroni-Methode der Volumina der fünf Kleinhirnschichten, jeweils getrennt für die drei untersuchten Gruppen (n=9 SIDS-Fälle, n=14 Kontrollen; n=9 gematchte Kontrollen). äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz. \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001.

	SIDS-Fälle	Alle Kontrollen	Gematchte Kontrollen
P-Wert der ANOVA	<0,001	<0,001	<0,001
P-Werte des paarweisen Vergleichs:			
äGZS vs. MS	***	***	***
äGZS vs. PZS	>0,05	>0,05	>0,05
äGZS vs. iGZS	***	***	***
äGZS vs. WS	>0,05	**	>0,016
MS vs. PZS	***	***	***
MS vs. iGZS	>0,05	>0,05	>0,05
MS vs WS	**	>0,016	>0,016
PZS vs iGZS	***	***	***
PZS vs. WS	>0,016	**	>0,016
iGZS vs WS	***	***	**

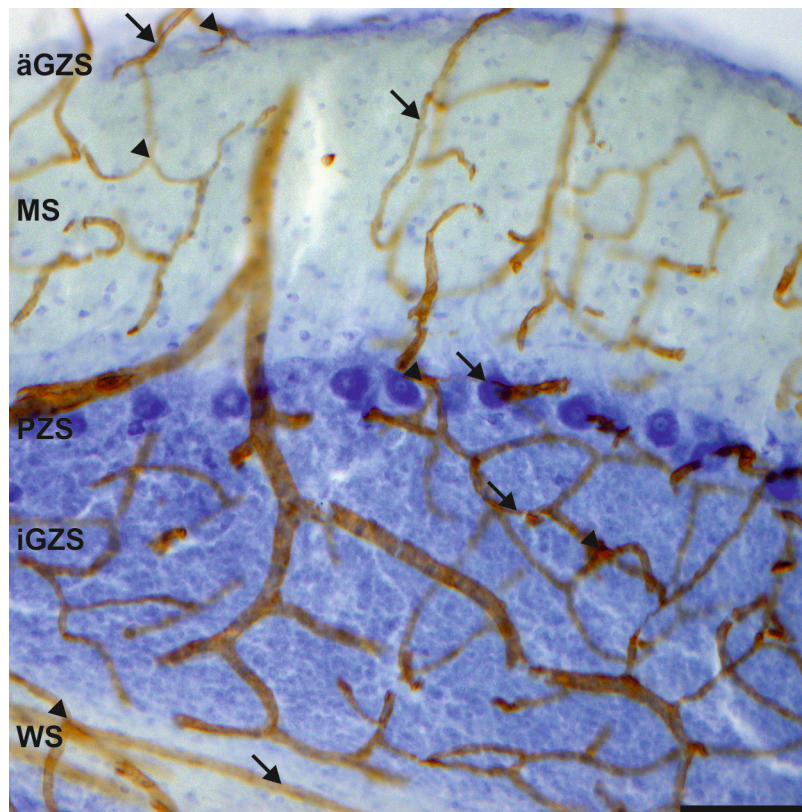
### 3.3 Mikrogefäßlängendichten der untersuchten Kleinhirnschichten

#### 3.3.1 Histologische Übersicht

Die Abbildungen 3.12 und 3.13 zeigen repräsentative Übersichten über alle fünf Schichten des menschlichen Kleinhirns im Alter von 0,03 Monaten (d.h. ein Tag postnatal; Abbildung 3.12) bzw. 10 Monaten (Abbildung 3.13) nach immunhistochemischem Nachweis von Kollagen IV und Gegenfärbung mit Cresylviolett. Die Pfeile markieren Mikrogefäße, die Pfeilspitzen Verzweigungen der Gefäße. Es ist ersichtlich, dass altersunabhängig in allen fünf Kleinhirnschichten sowohl Mikrogefäße als auch Verzweigungen der Gefäße auftraten (dieser Befund wird in der Diskussion wieder aufgegriffen). Die Identifizierung von Mikrogefäßen und ihre Unterscheidung von größeren Gefäßen (mittels der *Fast measure line* Funktion der *Stereo Investigator Software*) war problemlos möglich.



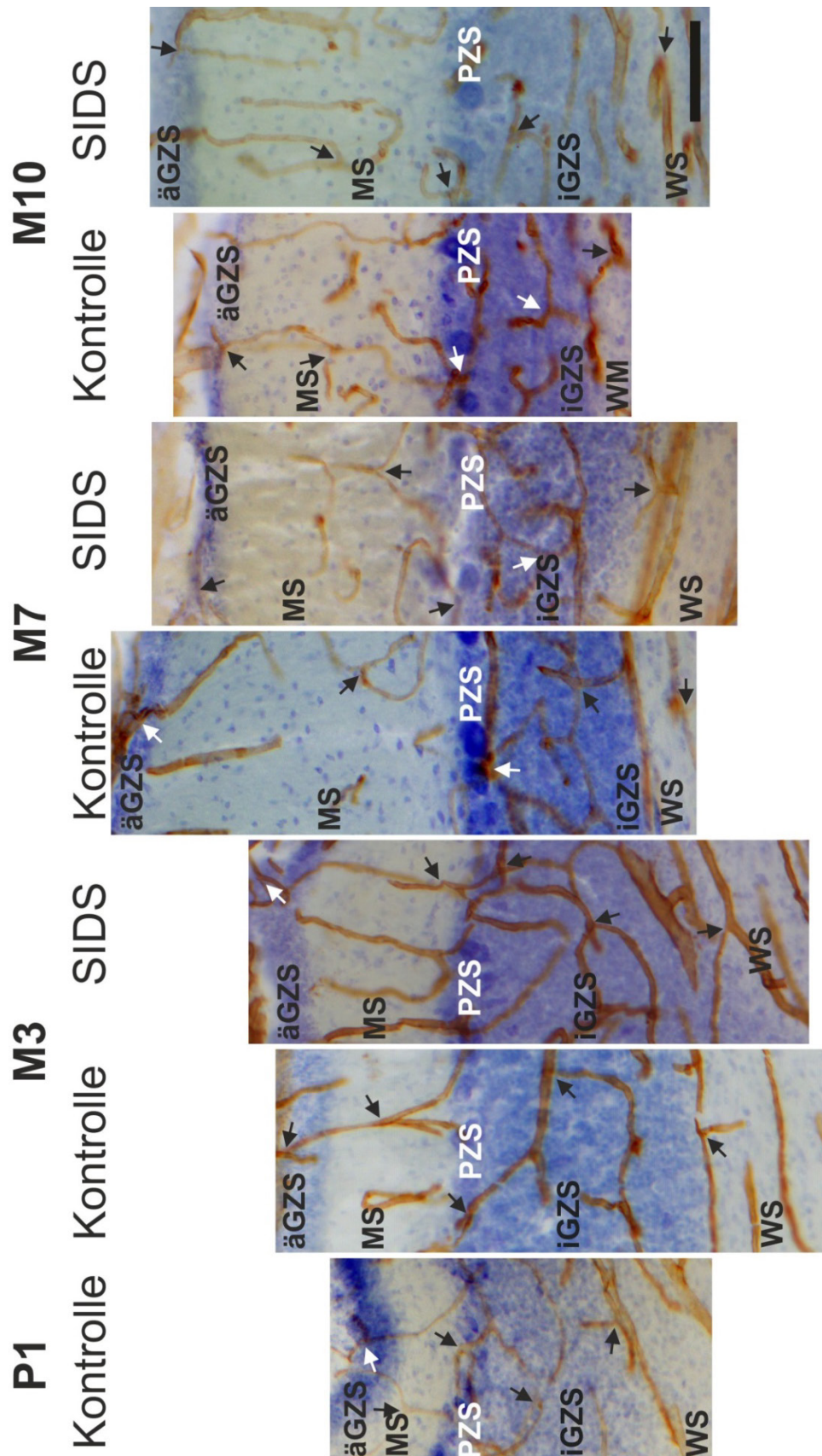
**Abbildung 3.12:** Übersicht über alle fünf Schichten des Kleinhirns der Fallnummer 10/76 (Alter: 0,03 Monate) nach immunhistochemischem Nachweis von Kollagen IV und Gegenfärbung mit Cresylviolett. Die Pfeile markieren Mikrogefäße, die Pfeilspitzen Verzweigungen der Gefäße. äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz. Der Messbalken entspricht 100 µm.



**Abbildung 3.13:** Übersicht über alle fünf Schichten des Kleinhirns der Fallnummer 10/88 (Alter: 10 Monate) nach immunhistochemischem Nachweis von Kollagen IV und Gegenfärbung mit Cresylviolett. Die Pfeile markieren Mikrogefäße, die Pfeilspitzen Verzweigungen der Gefäße. äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz. Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 3.14 ist ein repräsentativer Vergleich von Übersichten über alle fünf Schichten des menschlichen Kleinhirns zwischen SIDS-Fällen und Kontrollen bei verschiedenen Altersstufen nach immunhistochemischem Nachweis von Kollagen IV und Gegenfärbung mit Cresylviolett dargestellt. In diesem Vergleich ist kein Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und den jeweils gematchten Kontrollen ersichtlich, was eine detaillierte stereologische Untersuchung rechtfertigte.





**Abbildung 3.14:** Repräsentativer Vergleich von Übersichten über alle fünf Schichten des menschlichen Kleinhirns zwischen SIDS-Fällen und Kontrollen bei verschiedenen Altersstufen nach immunhistochemischem Nachweis von Kollagen IV und Gegenfärbung mit Cresylviolett. Die Pfeile

markieren Verzweigungen der Gefäße. äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz. P1: erster postnataler Tag; M3: drei Monate; M7: sieben Monate; M10: zehn Monate. Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2 Tabellarische Übersicht über alle Ergebnisse

Die Tabellen 3.6 und 3.7 zeigen die ermittelten Mikrogefäßlängendichten der jeweils untersuchten Kleinhirnschichten (äußere Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, innere Granularzellschicht und weiße Substanz) in der Einheit  $\times 10^3 \text{ mm/mm}^3$  sowie die zugehörigen Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte.

Bei der Betrachtung der Mittelwerte fiel auf, dass, ausgehend von den  $n=14$  Kontrollen als 100%, die Verminderung der Mikrogefäßlängendichte bei den  $n=9$  SIDS-Fällen maximal 10,6% (in der Purkinjezellschicht) betrug. Bei den restlichen Schichten stellte sich die Verminderung folgendermaßen dar: äußere Granularzellschicht: 2,5%, Molekularschicht: 1,8%, innere Granularzellschicht: 4,1% und weiße Substanz: 7,6%. Die statistische Analyse dieser Daten ist in den Kapiteln 3.3.3 und 3.3.4 beschrieben.

**Tabelle 3.6:** Mikrogefäßlängendichte der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=9$  SIDS-Fällen in der jeweiligen Kleinhirnschicht (äußere Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, inneren Granularzellschicht und weißen Substanz). MW: Mittelwert, StAbw: Standardabweichung, SF: Standardfehler des Mittelwertes.

Fallnummer	Äußere Granular- zellschicht [ $\times 10^3$ $\text{mm/mm}^3$ ]	Molekular- schicht [ $\times 10^3$ $\text{mm/mm}^3$ ]	Purkinje- zellschicht [ $\times 10^3$ $\text{mm/mm}^3$ ]	Innere Granular- zellschicht [ $\times 10^3$ $\text{mm/mm}^3$ ]	Weißer Substanz [ $\times 10^3$ $\text{mm/mm}^3$ ]
10/67	1,186	1,988	2,905	2,252	1,869
10/50	1,246	1,665	3,148	2,375	1,785
10/68	1,262	1,660	3,172	2,250	2,221
10/54	0,882	1,716	2,629	2,123	1,341
10/55	1,365	2,204	3,224	2,680	2,357
10/47	1,661	2,261	2,704	2,316	1,625
10/73	1,168	1,940	2,655	2,548	1,743
10/78	1,081	1,742	1,992	2,148	1,071
10/88	1,765	2,228	2,709	2,476	1,563
MW	1,291	1,934	2,793	2,352	1,731
StAbw	0,275	0,250	0,382	0,186	0,400
SF	0,092	0,083	0,127	0,062	0,134

**Tabelle 3.7:** Mikrogefäßlängendichte der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=14 Kontrollen in der jeweiligen Kleinhirnschicht (äußere Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, inneren Granularzellschicht und weißen Substanz). MW: Mittelwert, SA: Standardabweichung, SF: Standardfehler des Mittelwertes. Bei den mit \* markierten Fallnummern handelt es sich um die n=9 gematchten Kontrollen.

Fallnummer	Äußere Granularzellschicht [x10 <sup>3</sup> mm/mm <sup>3</sup> ]	Molekularschicht [x10 <sup>3</sup> mm/mm <sup>3</sup> ]	Purkinjezellschicht [x10 <sup>3</sup> mm/mm <sup>3</sup> ]	Innere Granularzellschicht [x10 <sup>3</sup> mm/mm <sup>3</sup> ]	Weißer Substanz [x10 <sup>3</sup> mm/mm <sup>3</sup> ]
10/46	1,910	2,187	4,511	2,930	2,149
10/76	1,307	2,812	5,375	3,391	3,222
10/70	0,866	1,542	2,347	2,175	1,985
10/79*	1,050	1,419	2,519	1,944	1,689
10/71*	1,365	2,003	3,602	2,438	2,038
10/80*	1,018	1,514	2,982	2,585	2,152
10/99*	1,628	2,100	3,403	2,342	2,269
10/92*	1,443	1,665	2,495	1,869	1,501
10/64	1,104	1,766	2,529	2,346	1,174
10/84*	1,265	2,221	3,139	2,503	1,957
10/45*	0,794	1,526	2,612	2,188	1,250
10/58*	1,839	2,469	2,824	2,770	1,567
10/65*	1,116	2,166	2,540	2,539	1,335
10/77	1,828	2,179	2,845	2,323	1,939
MW	1,324	1,969	3,123	2,453	1,873
StAbw	0,364	0,411	0,869	0,395	0,527
SF	0,097	0,110	0,232	0,105	0,141
MW*	1,280	1,898	2,902	2,353	1,751
StAbw *	0,327	0,375	0,409	0,300	0,367
SF*	0,109	0,125	0,136	0,100	0,122

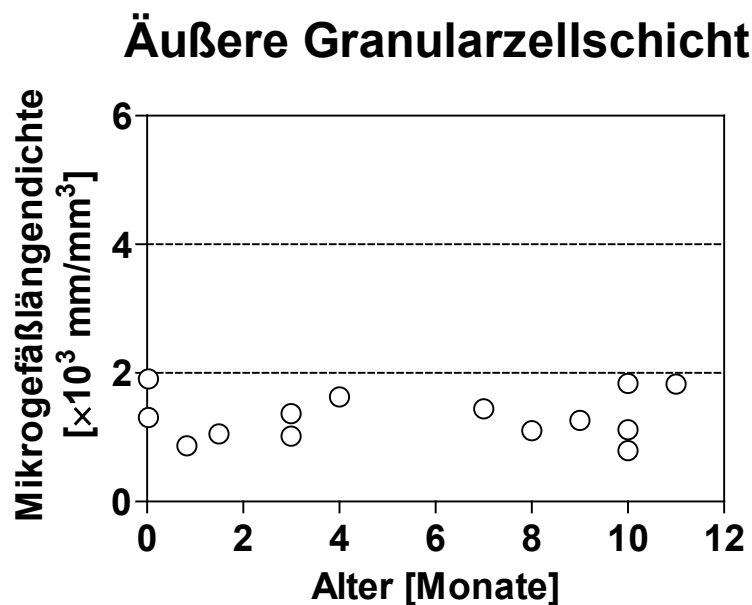
### 3.3.3 Statistische Analyse der Mikrogefäßlängendichten der n=14 Kontrollen

Die Abbildungen 3.15 bis 3.19 stellen die Mikrogefäßlängendichte der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=14 Kontrollen in der jeweils untersuchten Kleinhirnschicht (äußere Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, inneren Granularzellschicht und weißen Substanz) dar. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle, die gestrichelten Linien das Ergebnis der statistischen Analyse der gezeigten Daten mittels linearer Regression.

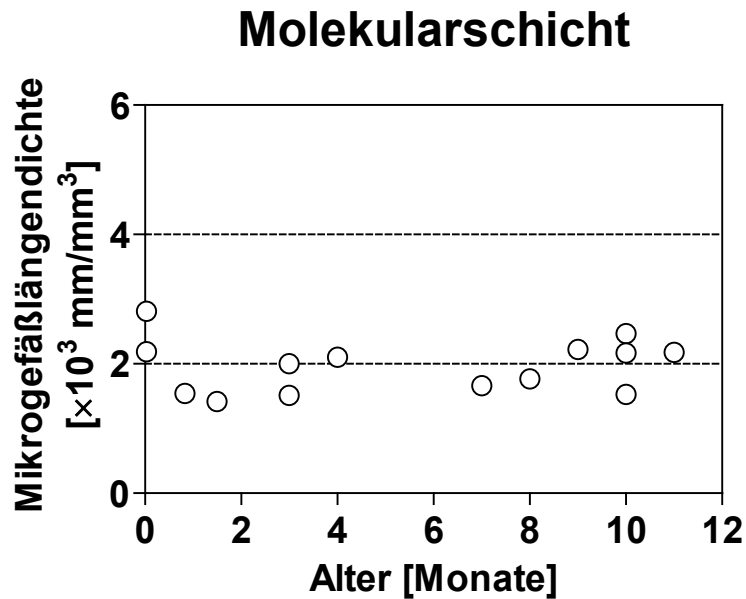


In der äußeren Granularzellschicht, der Molekularschicht und der inneren Granularzellschicht ergab die statistische Analyse mittels linearer Regression keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p > 0,05$ ).

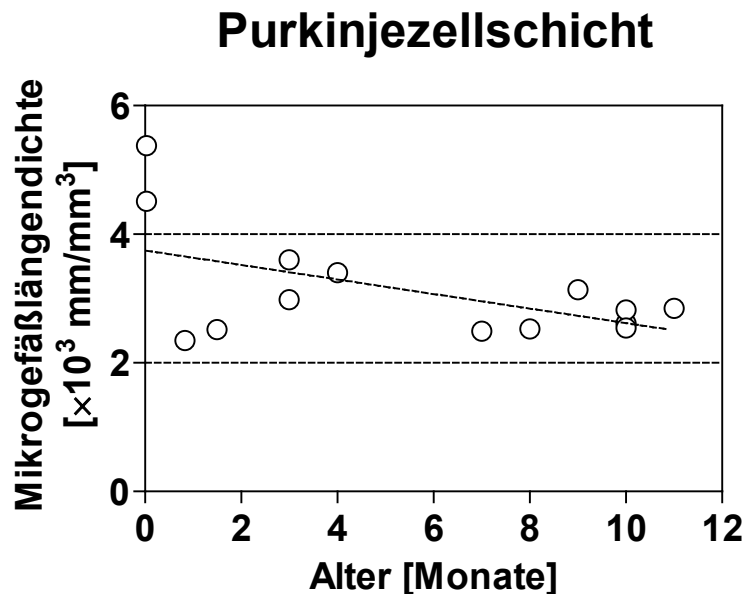
Für die übrigen Schichten im Kleinhirn fand sich eine statistisch signifikante (d.h.  $p < 0,05$ ) Abnahme der Mikrogefäßlängendichte mit zunehmendem Lebensalter.



**Abbildung 3.15:** Mikrogefäßlängendichte in der äußeren Granularzellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=14$  Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p=0,793$ ); dementsprechend ist in der Abbildung keine Regressionsgerade gezeigt.

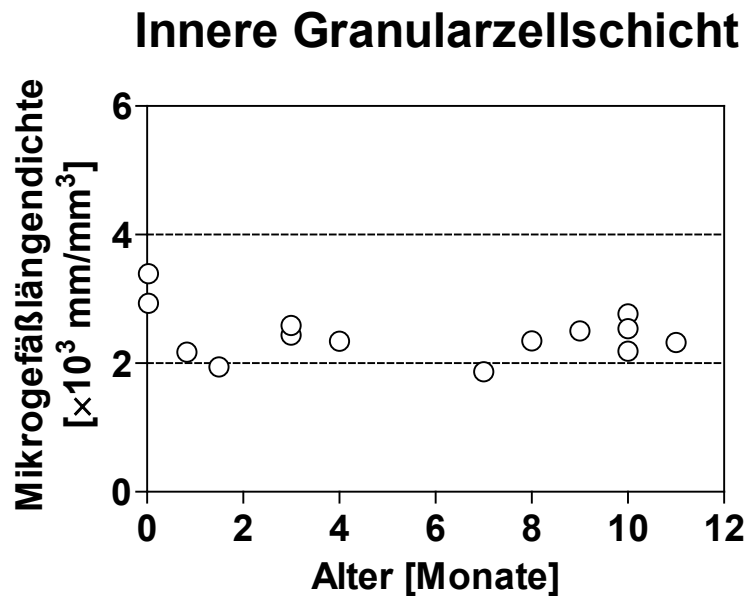


**Abbildung 3.16:** Mikrogefäßlängendichte in der Molekularschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=14$  Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p=0,823$ ); dementsprechend ist in der Abbildung keine Regressionsgerade gezeigt.

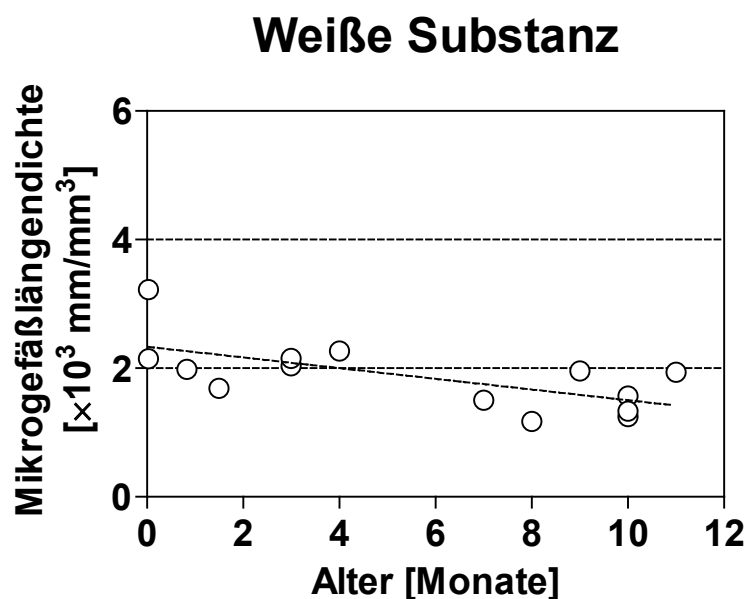


**Abbildung 3.17:** Mikrogefäßlängendichte in der Purkinjezellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=14$  Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle; die gestrichelte Linie das Ergebnis der statistischen Analyse der

gezeigten Daten mittels linearer Regression, in diesem Fall einer von Null statistisch signifikant verschiedenen Regressionsgeraden ( $p=0,046$ ).



**Abbildung 3.18:** Mikrogefäßlängendichte in der inneren Granularzellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=14$  Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p=0,364$ ); dementsprechend ist in der Abbildung keine Regressionsgerade gezeigt.



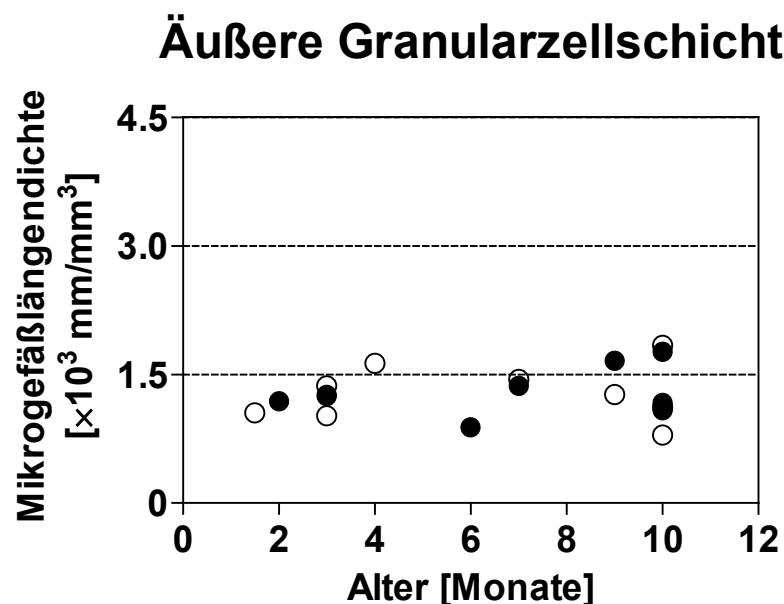
**Abbildung 3.19:** Mikrogefäßlängendichte in der weißen Substanz der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=14$  Kontrollen in Abhängigkeit vom Alter. Die weißen Punkte

repräsentieren individuelle Fälle; die gestrichelte Linie das Ergebnis der statistischen Analyse der gezeigten Daten mittels linearer Regression, in diesem Fall einer von Null statistisch signifikant verschiedenen Regressionsgeraden ( $p=0,011$ ).

### 3.3.4 Statistischer Vergleich der Mikrogefäßlängendichten der $n=9$ SIDS-Fälle und der $n=9$ gematchten Kontrollen

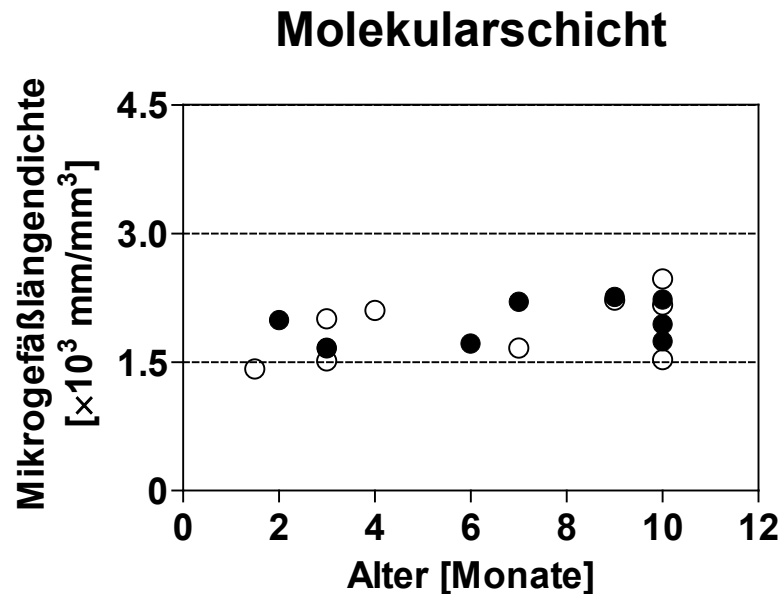
Die Abbildungen 3.20 bis 3.24 stellen die Mikrogefäßlängendichten der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=9$  SIDS-Fällen und den  $n=9$  gematchten Kontrollen in der jeweils untersuchten Kleinhirnschicht (äußere Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, inneren Granularzellschicht und weißen Substanz) dar. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle (weiße Punkte: gematchte Kontrollen; schwarze Punkte: SIDS-Fälle).

In allen untersuchten Kleinhirnschichten ergab die lineare Regressionsanalyse keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten ( $p > 0,05$ ) und damit keine statistisch signifikante Änderung der Mikrogefäßlängendichte mit zunehmendem Lebensalter.

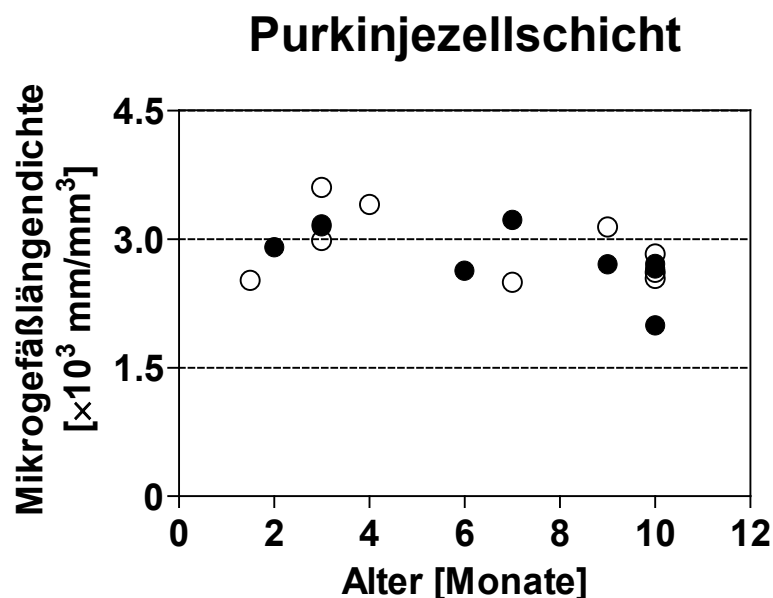


**Abbildung 3.20:** Mikrogefäßlängendichte in der äußeren Granularzellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den  $n=9$  SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den  $n=9$  gematchten Kontrollen (weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab keinen statistisch signifikant von Null

verschiedenen Regressionskoeffizienten bei den n=9 SIDS-Fällen ( $p=0,391$ ) bzw. den n=9 gematchten Kontrollen ( $p=0,863$ ); dementsprechend sind in der Abbildung keine Regressionsgeraden gezeigt.

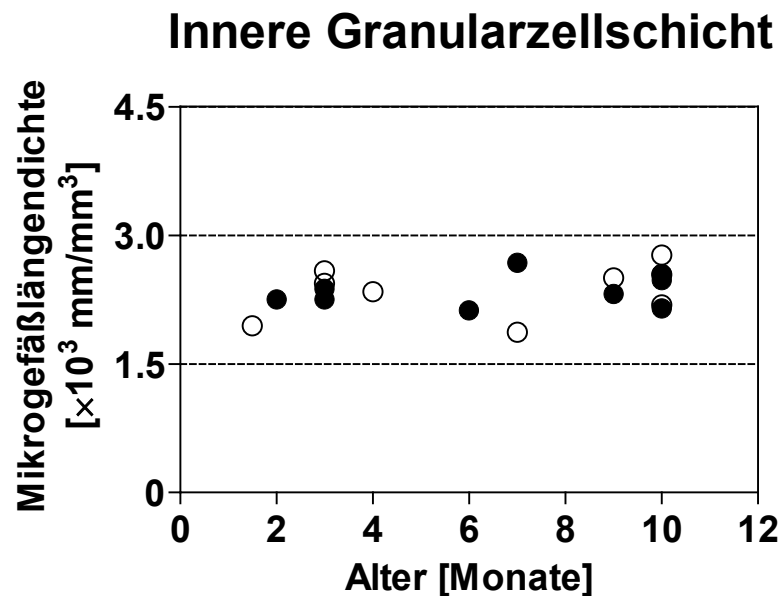


**Abbildung 3.21:** Mikrogefäßlängendichte in der Molekularschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=9 SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten bei den n=9 SIDS-Fällen ( $p=0,206$ ) bzw. den n=9 gematchten Kontrollen ( $p=0,178$ ); dementsprechend sind in der Abbildung keine Regressionsgeraden gezeigt.

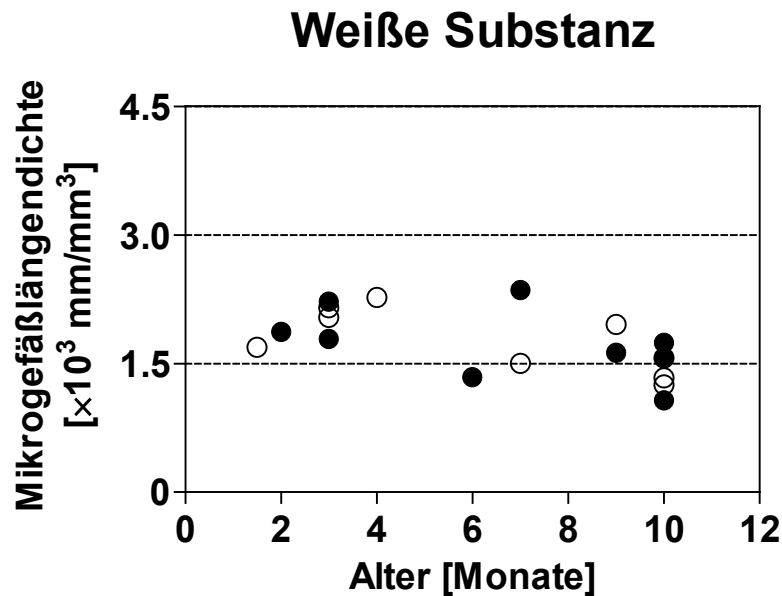


**Abbildung 3.22:** Mikrogefäßlängendichte in der Purkinjezellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=9 SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den n=9 gematchten Kontrollen

(weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten bei den n=9 SIDS-Fällen ( $p=0,059$ ) bzw. den n=9 gematchten Kontrollen ( $p=0,330$ ); dementsprechend sind in der Abbildung keine Regressionsgeraden gezeigt.



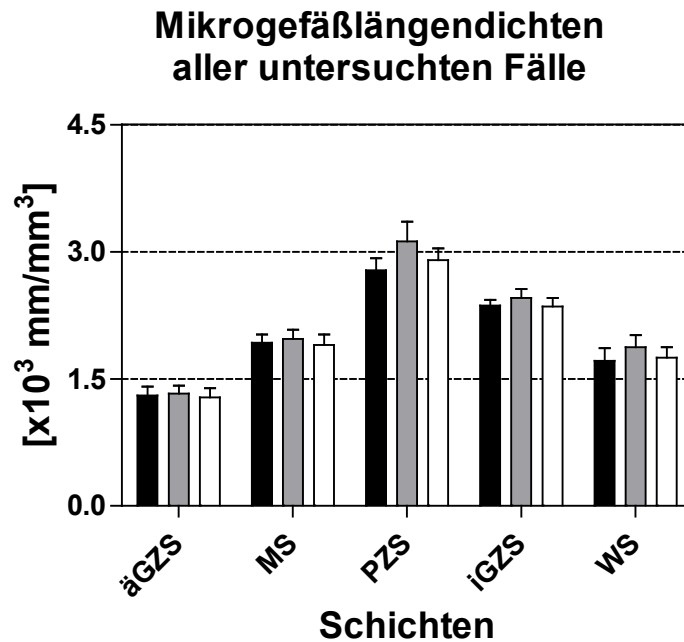
**Abbildung 3.23:** Mikrogefäßlängendichte in der inneren Granularzellschicht der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=9 SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten bei den n=9 SIDS-Fällen ( $p=0,485$ ) bzw. den n=9 gematchten Kontrollen ( $p=0,414$ ); dementsprechend sind in der Abbildung keine Regressionsgeraden gezeigt.



**Abbildung 3.24:** Mikrogefäßlängendichte in der weißen Substanz der jeweils untersuchten Kleinhirnhälften bei den n=9 SIDS-Fällen (schwarze Punkte) und den n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) in Abhängigkeit vom Alter. Die Punkte repräsentieren individuelle Fälle. Die statistische Analyse mittels linearer Regression ergab keinen statistisch signifikant von Null verschiedenen Regressionskoeffizienten bei den n=9 SIDS-Fällen ( $p=0,186$ ) bzw. den n=9 gematchten Kontrollen ( $p=0,051$ ); dementsprechend sind in der Abbildung keine Regressionsgeraden gezeigt.

Abbildung 3.25 zeigt die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Mikrogefäßlängendichte in den fünf Kleinhirnschichten der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Balken), der n=14 Kontrollen (graue Balken) und der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Balken). Die Ergebnisse der *repeated measures* ANOVA und des paarweisen Vergleichs mit der Bonferroni-Methode sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Bis auf wenige Ausnahmen (alle Gruppen: Molekularschicht vs. weiße Substanz; Kontrollen: Molekularschicht vs. innere Granularzellschicht) unterschieden sich alle Schichten statistisch signifikant voneinander ( $p<0,016$ ).

Dagegen ergab der Vergleich der Mittelwerte der n=9 SIDS-Fälle und der n=9 gematchten Kontrollen mit Hilfe des nichtparametrischen Wilcoxon „signed rank“ Tests keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (äußere Granularzellschicht:  $p=0,820$ ; Molekularschicht:  $p=0,652$ ; Purkinjezellschicht:  $p=0,570$ ; innere Granularzellschicht:  $p=0,906$ ; weiße Substanz:  $p=0,820$ ).



**Abbildung 3.25:** Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Mikrogefäßlängendichte in den fünf Kleinhirnschichten der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Balken), der n=14 Kontrollen (graue Balken) und der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Balken). äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz.

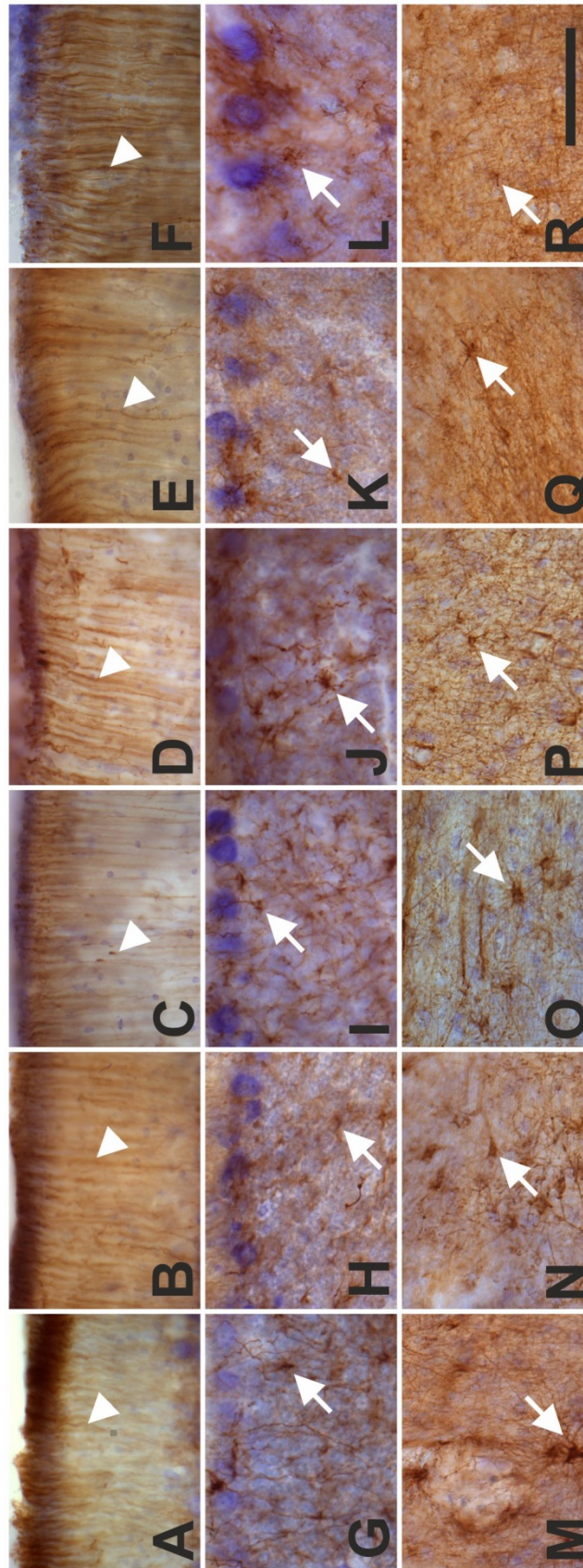
**Tabelle 3.8:** Ergebnisse der repeated measures ANOVA und des paarweisen Vergleichs mit der Bonferroni-Methode der Mikrogefäßlängendichte in den fünf Kleinhirnschichten, jeweils getrennt für die drei untersuchten Gruppen (n=9 SIDS-Fälle, n=14 Kontrollen; n=9 gematchte Kontrollen). äGZS: äußere Granularzellschicht; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; iGZS: innere Granularzellschicht; WS: weiße Substanz. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

	SIDS-Fälle	Alle Kontrollen	Gematchte Kontrollen
P-Wert der ANOVA	<0,001	<0,001	<0,001
P-Werte des paarweisen Vergleichs:			
äGZS vs. MS	***	***	***
äGZS vs. PZS	***	***	***
äGZS vs. iGZS	***	***	***
äGZS vs. WS	**	**	**
MS vs. PZS	***	***	***
MS vs. iGZS	**	>0,016	>0,016
MS vs WS	>0,05	>0,05	>0,05
PZS vs iGZS	**	***	**
PZS vs. WS	***	***	***
iGZS vs WS	***	**	***



### **3.4 Immunhistochemischer Nachweis von GFAP**

Abbildung 3.26 zeigt einen repräsentativen Vergleich des immunhistochemischen Nachweises von GFAP in allen fünf Schichten des menschlichen Kleinhirns zwischen SIDS-Fällen und Kontrollen bei verschiedenen Altersstufen. In der Molekularschicht waren bei allen Altersstufen die Bergmann-Gliafasern immunpositiv für GFAP, und in der Purkinjezellschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz bei allen Altersstufen die Astrozyten. Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und den jeweils zugeordneten Kontrollen waren nicht nachweisbar. Insbesondere fanden sich bei den SIDS-Fällen keine Anzeichen für Astrozyten-Aktivierung wie z. B. vergrößerte Perikarien oder kürzere, erweiterte Fortsätze.



**Abbildung 3.26:** Repräsentativer Vergleich von 100 µm dicken Sagittalschnitten aus dem Vermis der linken menschlichen Kleinhirnhälfte nach immunhistochemischem Nachweis von GFAP und Gegenfärbung mit Cresylviolett von Kontrollen (A,C,E,G,I,K,M,O,Q) und SIDS-Fällen

(**B,D,F,H,J,L,N,P,R**) im Alter von drei Monaten (**A,B,G,H,M,N**), sieben Monaten (**C,D,I,J,O,P**) und 10 Monaten (**E,F,K,L,Q,R**). In der Molekularschicht (**A-F**) waren bei allen Altersstufen die Bergmann-Gliafasern (Pfeilspitzen) immunpositiv für GFAP. In der Purkinjezellschicht und der inneren Granularzellschicht (**G-L**) sowie in der weißen Substanz (**M-R**) waren bei allen Altersstufen die Astrozyten (Pfeile) immunpositiv für GFAP. Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und den jeweils zugeordneten Kontrollen waren nicht nachweisbar. Insbesondere wurden bei den SIDS-Fällen keine Anzeichen für Astrozyten-Aktivierung wie z. B. vergrößerte Perikarien oder kürzere, erweiterte Fortsätze gefunden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Validität der Ergebnisse

Die Verwendung der *Space Balls* Methode zur Bestimmung von Mikrogefäßlängendichten in der hier vorliegenden Arbeit hat gegenüber anderen „biased“ Verfahren (wie z. B. der einfachen Bestimmung der relativen Fläche auf einem Gehirnschnitt mit einer Bildverarbeitungs-Software wie z. B. ImageJ, in der Anschnitte von Mikrogefäßen gefunden werden) die spezifischen Vorteile, dass die Ergebnisse nicht durch die Dicke der Mikrogefäße bzw. ihre dreidimensionale Ausrichtung im Gewebe beeinflusst werden (Calhoun und Mouton, 2001; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006). Dies wurde u. a. dadurch erreicht, dass relativ dicke Schnitte analysiert wurden und die Analysen im dreidimensionalen Raum erfolgten. Die durch histologische Aufarbeitung entstehende Schrumpfung der Schnitte wurde einerseits durch die Vermessung der Dicke des Gewebes mit Auswahl der richtigen Größe der *Hemi-Space Balls* und andererseits durch eine entsprechende Korrekturfunktion der verwendeten *Stereo Investigator* Software erreicht. Dadurch konnte die Schrumpfung der Schnitte ausgeglichen werden und die Ergebnisse blieben *unbiased*. Im Vergleich zur stereologischen Analyse ist die Bestimmung von Gefäßlängendichten in dünnen Gewebeschnitten oder auf zweidimensionalen Bildern immer durch die Größe der Gefäße und deren Ausrichtung im Gewebe beeinflusst.

Die Mikrogefäßlängendichte in der weißen Substanz der n=14 Kontrollen zeigte eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Abnahme mit zunehmendem Alter (Abbildung 3.19). Wurde die Stichprobe jedoch auf die n=9 gematchten Kontrollen reduziert, so verhielten sich die Werte anschließend nicht statistisch signifikant (d.h.,  $p > 0,05$ ) zum Alter (Abbildung 3.24). Dies ist dadurch zu erklären, dass bei den n=14 Kontrollen die Fälle 10/46 und 10/76 enthalten waren, die mit einem Alter von nur einem postnatalen Tag sehr jung waren (Tabelle 3.2) und eine höhere Mikrogefäßlängendichte als die der anderen Kontrollen aufwiesen. Dies führte dazu, dass mit steigendem Alter die Mikrogefäßlängendichte abnahm und so eine statistische Signifikanz vorlag. Dieser Befund zeigt deutlich, wie wichtig es ist, bei Untersuchungen zum plötzlichen Kindstod Fälle und Kontrollen nach Kriterien wie Alter und Geschlecht zu matchen.

Vergleicht man alle ermittelten Werte für die Mikrogefäßlängendichte des Kleinhirns mit Daten vom menschlichen zerebralen Cortex (Kreczmanski et al., 2009), so ist ersichtlich, dass die mittlere Mikrogefäßlängendichte im Kleinhirn in etwa doppelt so hoch ist wie die des zerebralen Cortex (die Ergebnisse von Kreczmanski et al. 2009 wurden ebenfalls mit der *Space Balls* Methode generiert). Dieser Befund passt gut zu Daten von Johanson (1980), der zeigte, dass im Kleinhirn der Ratte die Gefäßversorgung stärker ausgeprägt ist als im Großhirn.

Die hier vorgelegten Volumendaten für die einzelnen Schichten des Kleinhirns stimmen mit denen von Kiessling et al. (2013a, 2013b) gut überein (in allen drei Studien wurde an denselben Kleinhirnen und mit identischer Methode, aber an unterschiedlichen Kleinhirnschnitten gearbeitet). Dies betrifft alle Kleinhirnschichten bis auf die äußere Granularzellschicht (die Volumendaten der äußeren Granularzellschicht in Kiessling et al. (2013a, 2013b) stammen aus der hier vorliegenden Arbeit).

Bei der Betrachtung weiterer Arbeiten zu Volumina der einzelnen Kleinhirnschichten im menschlichen Gehirn (Andersen et al., 1992; Andersen und Pakkenberg, 2003) fällt auf, dass die dort erhobenen Daten größer sind als die Daten der hier vorliegenden Arbeit. Dies liegt daran, dass in der hier vorliegenden Arbeit Kinder im ersten Lebensjahr untersucht wurden, in den Arbeiten von Andersen et al. (1992) und Andersen und Pakkenberg (2003) jedoch Erwachsene. Da sich im Laufe der Entwicklung das Volumen der einzelnen Schichten des Kleinhirns ändert, sind die unterschiedlichen Werte damit zu erklären.

Der immunhistochemische Nachweis von GFAP zeigte das bekannte Bild von immunpositiven Bergmann-Gliafasern in der Molekularschicht sowie immunpositive Astrozyten in der Purkinjezellschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz (vgl. z. B. Kántor et al., 2007).

Tabelle 4.1 zeigt die Hypoxiewahrscheinlichkeit der n=14 Kontrollen in Abhängigkeit von der Diagnose. Alle Kontrollen wurden nun in Bezug auf ihre Hypoxiewahrscheinlichkeit in zwei Gruppen eingeteilt; die eine mit einer geringen Hypoxiewahrscheinlichkeit Kontrollen (10/46, 10/76, 10/70, 10/71, 10/80, 10/92, 10/64, 10/84 und 10/58), die andere mit einer hohen Hypoxiewahrscheinlichkeit (Kontrollen 10/79, 10/99, 10/45, 10/65 und 10/77). Anschließend wurden für beide Gruppen die schichtenspezifischen mittleren Mikrogefäßlängendichten sowie die mittleren Gesamtzahlen von Purkinjezellen (in denselben Kleinhirnhälften wie in der vorliegenden Arbeit untersucht) berechnet. Die Gesamtzahlen von Purkinjezellen wurden der Arbeit von Kiessling et al. (2013a) entnommen. Da die beiden Kontrollen 10/46 und 10/76 schon am ersten Postnataltag verstorben waren und zu diesem Zeitpunkt höhere Mikrogefäßlängendichten im Kleinhirn vorlagen als bei den anderen Kontrollen (Tabelle 3.7), wurden diese beiden Kontrollen bei den Berechnungen der mittleren Mikrogefäßlängendichte im Vergleich der beiden Gruppen in der folgenden Tabelle 4.2 nicht berücksichtigt. Für die Gesamtzahl von Purkinjezellen hatten Kiessling et al. (2013a) keine altersabhängigen Änderungen bei allen n=14 Kontrollen gefunden. Tabelle 4.2 zeigt den statistischen Vergleich der beiden Gruppen (geringe bzw. hohe Hypoxiewahrscheinlichkeit) mittels nicht-parametrischem Mann Whitney Test. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Diese Daten zeigen, dass man die Möglichkeit, dass die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit durch Hypoxie in der Kontrollgruppe verfälscht wurden, mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit

ausschließen konnte (die Diskussion der Gesamtzahlen von Purkinjezellen in Zusammenhang mit Hypoxie wird in Kapitel 4.2 wieder aufgegriffen).

**Tabelle 4.1:** Hypoxiewahrscheinlichkeit der n=14 Kontrollen.

Fallnummer	Alter [Monate]	Diagnose	Hypoxie- wahrscheinlichkeit
10/46	0,03	Ersticken	Gering
10/76	0,03	Erwürgen	Gering
10/70	0,83	Tötung (Ersticken)	Gering
10/79	1,5	Herzfehler	Hoch
10/71	3	Infekt	Gering
10/80	3	Waterhouse- Friderichsen Syndrom	Gering
10/99	4	Unklar	Hoch
10/92	7	Erwürgen	Gering
10/64	8	Otitis media	Gering
10/84	9	MCAD-Syndrom / Adrenogenitales Syndrom	Gering
10/45	10	Sepsis	Hoch
10/58	10	CO-Intoxikation	Gering
10/65	10	Myokarditis	Hoch
10/77	11	Herzfehler	Hoch

**Tabelle 4.2:** Ergebnisse des Gruppenvergleichs der Kontrollen mit geringer und hoher Hypoxiewahrscheinlichkeit.

Variable	Kontrollen mit geringer Hypoxie- wahrscheinlichkeit (MW $\pm$ StAbw)	Kontrollen mit hoher Hypoxie- wahrscheinlichkeit (MW $\pm$ StAbw)	Ergebnis der statistischen Analyse mittels Mann-Whitney Test
Gesamtzahl an Purkinjezellen [ $\times 10^6$ ]:	12,76 $\pm$ 0,78	13,43 $\pm$ 0,82	p=0,364
Mittlere Mikrogefäßlängendichten [ $\times 10^3$ mm/mm <sup>3</sup> ]:			
Äußere Granularzellschicht	1,27 $\pm$ 0,12	1,28 $\pm$ 0,19	p=1,000
Molekularschicht	1,88 $\pm$ 0,14	1,88 $\pm$ 0,17	p=0,876
Purkinjezellschicht	2,85 $\pm$ 0,17	2,78 $\pm$ 0,17	p=1,000
Innere Granularzellschicht	2,38 $\pm$ 0,11	2,27 $\pm$ 0,10	p=0,432
Weißer Substanz	1,77 $\pm$ 0,14	1,70 $\pm$ 0,19	p=0,755

## 4.2 Mikrogefäßlängendichte des Kleinhirns bei SIDS

Beim Vergleich der Werte der Mikrogefäßlängendichte der n=9 SIDS-Fälle mit denen der n=9 gematchten Kontrollen (Tabellen 3.6 und 3.7) fällt auf, dass sich die Werte der SIDS-Fälle nicht statistisch signifikant von den Werten der gematchten Kontrollen unterschieden. Dies bedeutet, dass mit Hilfe der Analyse der Mikrogefäßlängendichte keine Hinweise für chronische Hypoxie im Kleinhirn bei SIDS feststellbar waren. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung mittels GFAP-Markierung von Astrozyten (Kapitel 3.4) unterstützt, bei der sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und den Kontrollen zeigten.

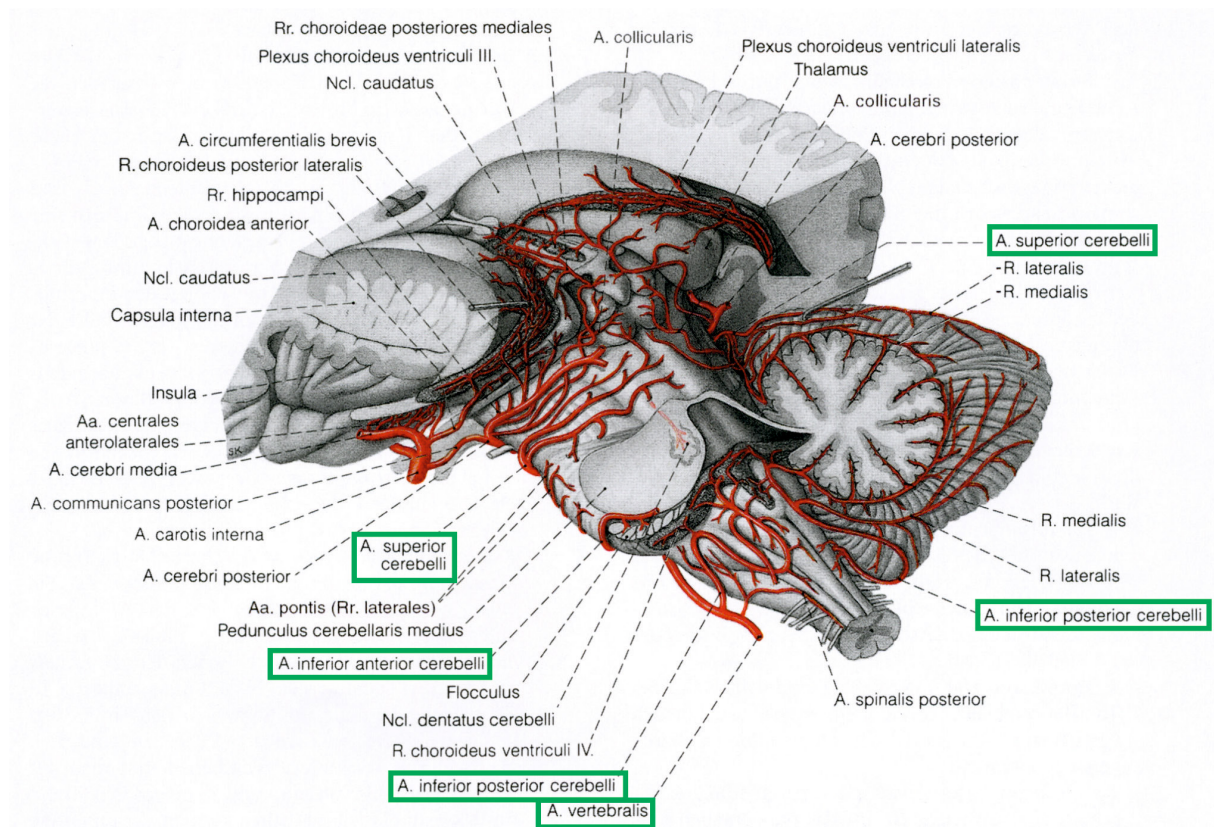
Da SIDS bis heute eine Ausschlussdiagnose ist (d. h. Diagnosestellung nach Ausschluss aller anderen Krankheitsursachen und definitionsgemäß nur *post mortem* möglich), wurde in der Literatur der Fokus der Untersuchungen auf den Hirnstamm gelegt, der u. a. das Zentrum für kardiovaskuläre Kontrolle und das Atemzentrum beherbergt. Dies ist insofern relevant, als dass bei SIDS augenscheinlich gesunde Kinder (Byard und Krous, 2004) plötzlich nach einer Schlafperiode tot aufgefunden werden (Steinschneider, 1972; Guilleminault et al., 1975). Außerdem wurden in verschiedenen Studien (zur Übersicht siehe Kinney, 2009) unterschiedlichste Symptome bei SIDS beschrieben. Dazu gehörten Schlafapnoe, episodische Tachykardie bzw. Bradykardie, Blutdruck- und Pulsabweichungen. Dies führte dann u. a. zu Empfehlungen hinsichtlich der Schlafposition des Kindes (zur Vermeidung von Sauerstoffunterversorgung) (Mitchell et al., 1991; Gilbert et al., 2005). Neben den Hirnstammuntersuchungen wurden in Arbeiten von Kinney (2009) und Paterson et al. (2006) bei SIDS u. a. eine gesteigerte Dichte serotonerger Neurone einhergehend mit einem einfacheren Aufbau und einer Entwicklungsstörung des Hirnstamms festgestellt. Dies war insofern bemerkenswert, als dass in Verbindung mit dem Risikofaktor mütterlichen Rauchens bei SIDS die Proliferation des serotonergen Systems beeinträchtigt war.

Machaalani et al. (2009) beschrieben bei SIDS eine verminderte 5-HT<sub>1A</sub>R (5 Hydroxytryptamin = Serotonin Rezeptor) Immunreaktivität im Hirnstamm. Auch die Untersuchungen von Paterson et al. (2006) deuteten auf 5-HT Anomalie in der Medulla oblongata hin. Da der Hirnstamm, wie oben ausgeführt, u. a. das Atemzentrum beherbergt, könnten Rezeptoranomalien auch als Erklärung für den plötzlich eintretenden Tod bei SIDS durch exogene Faktoren wie Schlaflage, Schlafapnoe etc. dienen, da hier die protektiven Systeme, die bei einem gesunden Hirnstamm kleinere Ungleichheiten ausgleichen können (z. B. „arousal“ Reaktion mit Wenden des Kopfes zum Luftholen), in Mitleidenschaft gezogen sein könnten. In einer Arbeit von Kinney (2009) wurden neben dem oben beschriebenen Transmitter bzw. seinem Rezeptor weitere Transmitterabnormalitäten beschrieben, sodass die 5-HT Anomalität nicht als singuläre Abweichung der Transmittersysteme bei SIDS verstanden werden sollte. Rickert et al. (2009) zeigten, dass bei SIDS im Hirnstamm und im

Kleinhirn das Vorkommen leptomeningealer Neurone im Vergleich zu Kontrollen erhöht war. Leptomeningeale Neurone können als morphologischer Marker für Entwicklungsstörungen oder verzögerte Kleinhirnrreifung dienen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass nach Meinung von Rickert et al. (2009) das Vorkommen einzelner leptomeningealer Neurone in kindlichen Gehirnen normal sei. Oehmichen et al. (2009) zeigten mit Hilfe von MAP2 (Mikrotubuli assoziiertes Protein 2) Immunfärbungen, dass bei SIDS hypoxische Veränderungen in der Großhirnrinde und im Hippocampus vorlagen. MAP2 wird in der Literatur als Marker zur Detektion von Nervenzellverletzungen beschrieben (Oehmichen et al., 2009).

Die Blutversorgung des Hirnstamms und des Kleinhirns erfolgt gemeinsam durch die Arteriae (Aa.) vertebrales (Abbildung 4.1) und nach deren Fusion durch die Arteria (A.) basilaris. Dazu geben die Aa. vertebrales beidseits je eine A. inferior posterior cerebelli ab, und die A. basilaris die beiden Aa. inferiores anteriores cerebelli und die beiden Aa. superiores cerebelli (Abbildung 4.1). Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Mikrogefäßlängendichte im Kleinhirn, da detaillierte Daten von Kiessling et al. (2013a, 2013b) zur Gesamtzahl von Purkinje- und Granularzellen im menschlichen Kleinhirn während des ersten Lebensjahres und ihre möglichen Veränderungen bei SIDS vorliegen, die an denselben Kleinhirnhälften erhoben wurden wie die in der hier vorliegenden Arbeit vorgestellten Mikrogefäßlängendichten. Insbesondere Cruz-Sánchez et al. (1997) und Harper et al. (2000) hatten postuliert, dass das Kleinhirn eine wichtige Rolle in der Pathogenese von SIDS spielt. In den Untersuchungen von Kiessling et al. (2013a, 2013b), die ebenfalls mit *design-based* stereologischen Methoden durchgeführt wurden, konnten die von Cruz-Sánchez et al. (1997) postulierte Hypothese bezüglich einer Entwicklungsstörung des Kleinhirns bei SIDS nicht verifiziert werden.



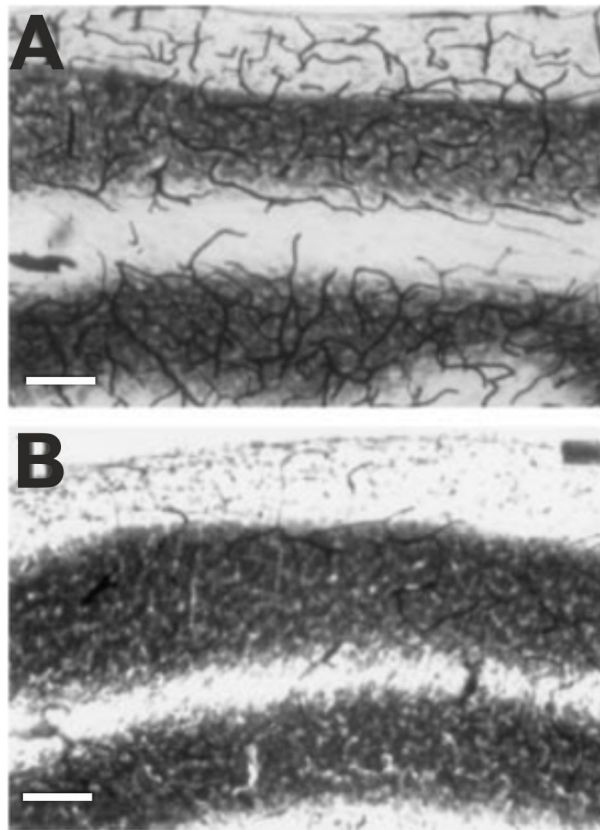


**Abbildung 4.1:** Darstellung der Gefäßversorgung des menschlichen Hirnstamms und des Kleinhirns (entnommen aus Benninghoff A, Drenckhahn, D. Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 2, 16. Ausgabe, Abbildung 12.14-9, Urban & Fischer, München, 2004). Die das Kleinhirn versorgenden Gefäße sind grün markiert.

Boero et al. (1999) stellten in einer Untersuchung an Mäusen fest, dass in verschiedenen Hirnregionen, u. a. auch im Kleinhirn, die Kapillarisation nach 28-tägigem Sauerstoffdefizit (Lebensalter zu Beginn des Sauerstoffdefizits: 21 Tage) im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Sauerstoffdefizit erhöht war (Abbildung 4.2; entnommen aus Boero et al., 1999). Diese Daten zeigen, dass zumindest bei Mäusen chronische Hypoxie zu einer vermehrten Kapillarisation und somit zu einer erhöhten Mikrogefäßlängendichte im Kleinhirn führt. Wie oben ausgeführt, konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine statistisch signifikante Steigerung der mittleren Mikrogefäßlängendichte bei den SIDS-Fällen im Vergleich zu den gematchten Kontrollen nachgewiesen werden. Unter der Annahme, dass bei vorliegender Hypoxie im Gewebe Angiogenesefaktoren ausgeschüttet werden (Liu und Chen, 1994), bedeutet dies, dass in der hier vorliegenden Arbeit bei SIDS im Kleinhirn kein Anzeichen für chronische Hypoxie (im Sinne einer hierdurch verstärkten Angiogenese) nachzuweisen war. Somit konnte die von Kinney (2009) postulierte Hypothese einer chronischen Hypoxie bei SIDS zumindest im Kleinhirn in den hier untersuchten SIDS-Fällen

nicht bestätigt werden, so dass die eingangs formulierte Hypothese verworfen werden musste.

Betrachtet man darüber hinaus das akut hypoxische Geschehen im Kleinhirn, so reagieren die Purkinjezellen sehr anfällig auf akute Hypoxie oder Ischämie (Pae et al., 2005; Hausmann et al., 2007; Bartschat et al., 2012). Sie sind somit gut als *post mortem* Indikator für akute Ischämie geeignet. Bartschat et al. (2012) zeigten in einer *post mortem* Studie an Patienten, die an akuter Hypoxie verstorben waren, eine verringerte Konzentration von Calbindin-D28k (Calbindin-D28k ist ein Calcium bindendes Protein, welches in hohen Konzentrationen im Zytosol von Purkinjezellen und anderen Neuronen gefunden wird). Purkinjezellen sind mit einem komplexen Calcium regulierenden System ausgestattet. Dies sind u. a. die Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum, Calcium bindende Proteine sowie Calciumpumpen (Katsetos et al., 2001). Calcium bindende Proteine sind dadurch charakterisiert, dass sie „helix-loop-helix“ Motive besitzen, welche Calciumionen mit hoher Affinität binden (Bartschat et al., 2012). Diese Calciumbindung dient u. a. dem Zellschutz vor Apoptose, dem programmierten Zelltod, und weiteren enzymatisch degenerativen Wegen (Katsetos et al., 2001). Somit ist Calbindin-D28k als verlässlicher Marker in der Diagnose akuter Hypoxie zu betrachten (Bartschat et al., 2012). Wichtig für die Forschung zu SIDS ist in diesem Zusammenhang, dass Kiessling et al. (2013b) unter Verwendung desselben Markers (Calbindin-D28k) keine Hinweise auf veränderte Calbindin-D28k Konzentrationen in den Purkinjezellen bei SIDS fanden.



**Abbildung 4.2:** Darstellung von Kapillaren im Kleinhirn der Maus nach chronischer Hypoxie (A) bzw. ohne Hypoxie (B). Die Messbalken entsprechen 40  $\mu\text{m}$ . Die Abbildung wurde einer Publikation von Boero et al. (1999) entnommen (dort Fig. 1.).

### 4.3 Mikrogefäßlängendichte des Kleinhirns während des ersten Lebensjahres

In der vorliegenden Arbeit wurden weder bei den n=9 SIDS-Fällen noch bei den n=9 gematchten Kontrollen altersabhängige Veränderungen hinsichtlich der Mikrogefäßlängendichte in den einzelnen Schichten des Kleinhirns gefunden. Dies bedeutet, dass trotz steigenden Volumens während des ersten Lebensjahres (Abbildungen 3.1 bis 3.5), die Dichte der Mikrogefäße in den untersuchten Schichten des Kleinhirns gleich blieb. Wie Tabelle 3.7 zu entnehmen ist, sind bei den n=14 Kontrollen die Fälle 10/46 und 10/76 mit einem Alter von nur einem postnatalen Tag die jüngsten und wiesen die höchsten Mikrogefäßlängendichten im Kleinhirn auf. Eine Hypothese, die diesen Befund erklären kann, basiert auf dem kurz nach der Geburt stattfindenden Wechsel von fetalem zu adultem Hämoglobin (Sankaran und Orkin, 2013). Hämoglobin ist ein eisenhaltiges Protein mit vier Hämgruppen sowie vier Globinuntereinheiten. Es lassen sich  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheiten unterscheiden. Beim Erwachsenenähmoglobin (HbA) liegen zwei  $\alpha$  und zwei  $\beta$  Untereinheiten vor. Fetales Hämoglobin (HbF) enthält im Unterschied dazu zwei  $\alpha$  und zwei

$\gamma$  Untereinheiten. Die  $\gamma$  Untereinheiten haben eine geringere Affinität zu 2,3-Bisphosphoglycerat, was die Sauerstoffaffinität von HbF im Vergleich zu HbA steigert. Schon 1941 wurde von Darling et al. (1941) gezeigt, dass das fetale Hämoglobin eine höhere Affinität zu Sauerstoff hat als das adulte Hämoglobin. Daher ist es gut möglich, dass es durch den Wechsel von fetalem zu adultem Hämoglobin während des ersten postnatalen Monats und der damit einhergehenden höheren Sauerstoffverfügbarkeit im sich entwickelnden Kleinhirn zu einer Abnahme der Mikrogefäßlängendichte kommt. Die höhere Sauerstoffverfügbarkeit ist durch die geringere Sauerstoffaffinität von HbA zu erklären, da dadurch die Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe erleichtert wird.

#### **4.4 Schichtenspezifische Unterschiede der Mikrogefäßlängendichte des Kleinhirns**

Die mittleren Mikrogefäßlängendichten der einzelnen Kleinhirnschichten (äußere Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, innere Granularzellschicht und weiße Substanz) der in der vorliegenden Arbeit untersuchten n=9 SIDS-Fälle und der n=9 gematchten Kontrollen unterschieden sich jeweils voneinander. Allerdings konnten beim Vergleich der Werte der mittleren Mikrogefäßlängendichten zwischen den n=9 SIDS-Fällen und den n=9 gematchten Kontrollen keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 3.25). In der Purkinjezellschicht war die mittlere Mikrogefäßlängendichte am höchsten, in der äußeren Granularzellschicht (proliferative Zone) am geringsten. Die geringere Mikrogefäßlängendichte in der proliferativen Zone mit der damit verbundenen geringeren Sauerstoffverfügbarkeit steht eventuell in Zusammenhang mit der Induktion der Proliferation von Granularzellen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die generelle Rolle des *hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha*, dessen Aktivierung die Proliferation von neuronalen Stammzellen in Versuchen mit Ratten, die moderater Hypoxie ausgesetzt waren, induzierte (Zhao et al., 2008). Auf das menschliche Kleinhirn übertragen bedeutet dies, dass eine geringere Sauerstoffkonzentration in der äußeren Granularzellschicht des Kleinhirns evtl. die Proliferation der dort befindlichen Vorläufer der Granularzellen fördert. Diese Hypothese wird durch Daten von Sentilhes et al. (2010) gestützt, die zeigen konnten, dass in der äußeren Granularzellschicht des menschlichen Kleinhirns sowie in etlichen anderen Hirnregionen, in denen Zellproliferation und –migration stattfinden, sowohl *vascular endothelial growth factor* (VEGF) als auch *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR-2) erhöht exprimiert wurden.

Die relativ hohe Mikrogefäßlängendichte in der Purkinjezellschicht, in der sich die Purkinjezellen als die einzigen efferenten Zellen der Kleinhirnrinde befinden und die sehr empfindlich auf hypoxische Schäden reagieren (Bartschat et al., 2012), ist evtl. u. a. durch

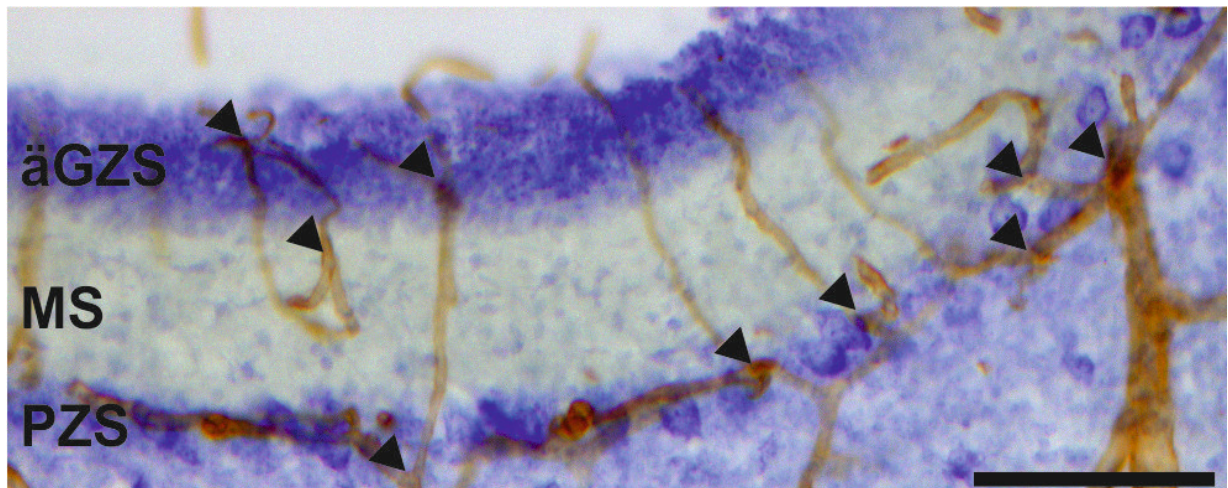
ihre Größe in Verbindung mit ihrer Differenzierung zu erklären (d.h., ausdifferenzierte Zellen mit großem Dendritenbaum könnten im Vergleich zu kleineren Zellen einen höheren Nährstoff- und Sauerstoffbedarf haben).

#### **4.5 Unterschiede in der Entwicklung der Mikrogefäßlängendichte des Kleinhirns zwischen Mensch und Ratte**

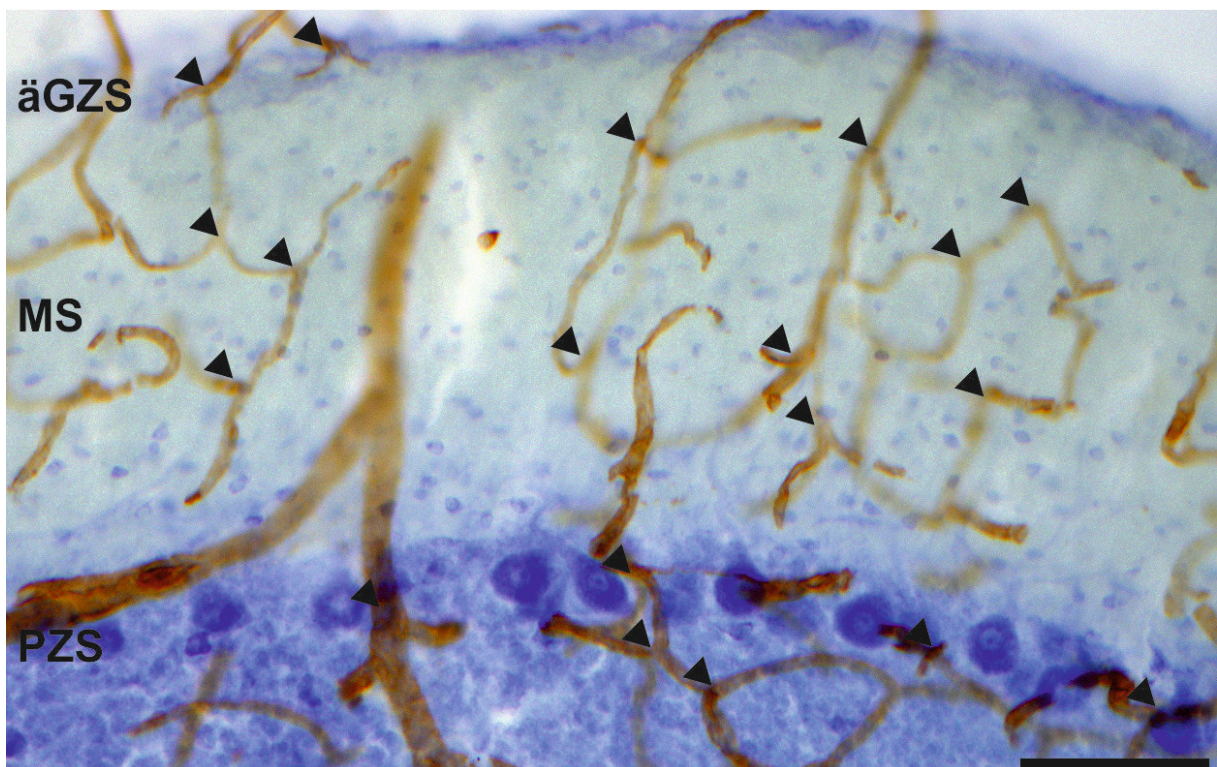
In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in allen Kleinhirnschichten unabhängig vom Alter und davon, ob ein SIDS-Fall oder eine Kontrolle vorlag, Gefäßverzweigungen nachweisbar waren (Abbildungen 3.12 und 3.13). In den Abbildungen 4.3 und 4.4 sind die äußere Granularzellschicht, Molekularschicht und die Purkinjezellschicht von zwei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kleinhirne vergrößert dargestellt; Gefäßverzweigungen wurden markiert. Es ist ersichtlich, dass in beiden gezeigten Kleinhirnschnitten unabhängig von Diagnose und Alter Gefäßverzweigungen deutlich sichtbar auftraten. Im Gegensatz dazu wurde von Yu et al. (1994) in einer Untersuchung an Kleinhirnen von Ratten unter anderem festgestellt, dass in der äußeren Granularzellschicht bis zum postnatalen Tag 18 (entspricht beim Menschen in etwa dem Ende des 1. postnatalen Lebensjahres) keine Gefäßverzweigungen auftraten (Abbildung 4.5). Die Versorgung dieser Schicht wird laut Yu et al. (1994) im Gegensatz zur Angiogenese durch Diffusion durch die darüber liegenden pialen Gefäße übernommen. Hier scheint also ein Unterschied in der Entwicklung der Gefäßversorgung des Kleinhirns zwischen Mensch und Ratte vorzuliegen.

In diesem Zusammenhang sei angemerkt, dass auch die Entwicklung der Granularzellen im Kleinhirn bei Nagetieren zeitlich anders verläuft als beim Menschen, nämlich vollständig postnatal (Shimada et al., 1977). Beim menschlichen Kleinhirn hingegen erfolgt die Entwicklung der Granularzellen sowohl prä- als auch postnatal (Rakic und Sidman, 1970; Sidman und Rakic, 1973; Kiessling et al., 2013a). Diese Unterschiede zeigen deutlich auf, dass Befunde, die an Nagern oder anderen Tieren erhoben werden, hinsichtlich der Entwicklung des Kleinhirns nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind.

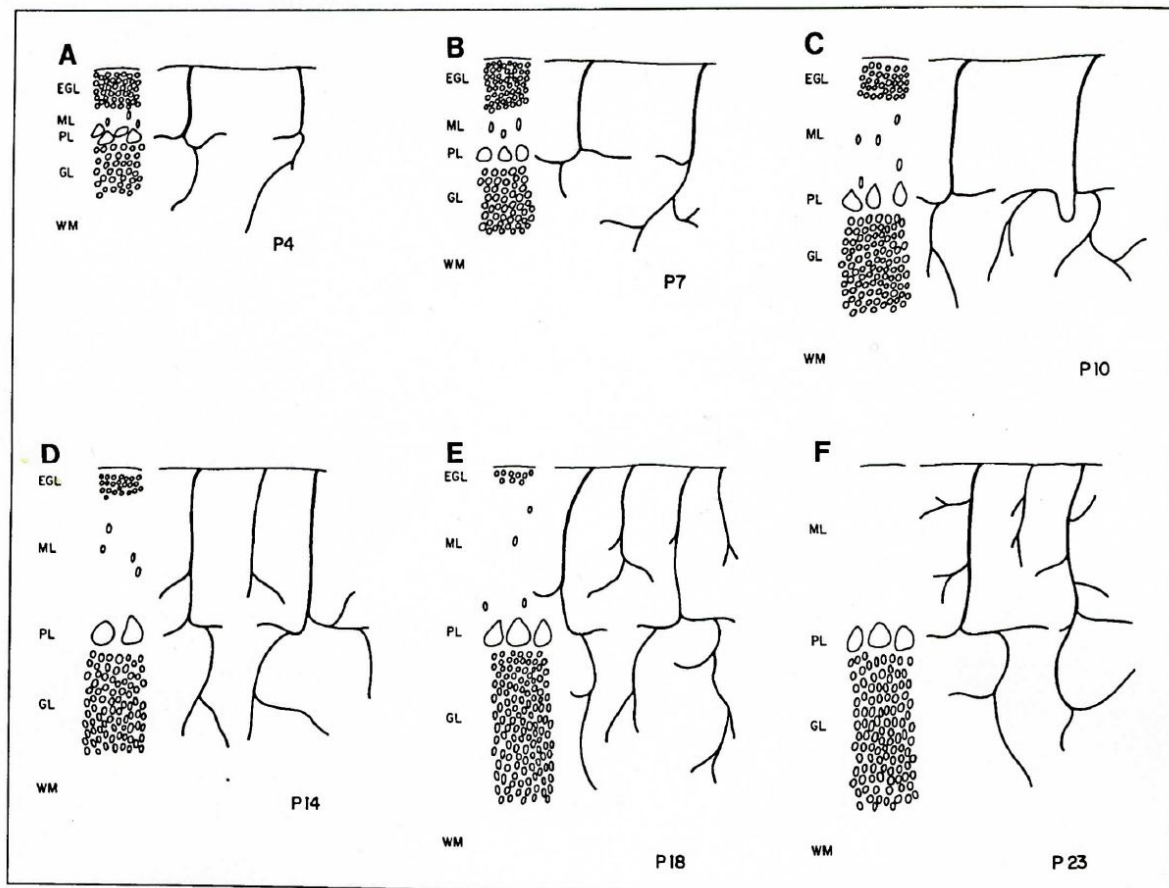




**Abbildung 4.3:** Übersicht über die drei obersten Schichten des Kleinhirns und zusätzlicher Markierung von Gefäßverzweigungen (Pfeilspitzen) nach immunhistochemischem Nachweis von Kollagen IV und Gegenfärbung mit Cresylviolett. Gezeigt sind die äußere Granularzellschicht (äGZS), Molekularschicht (MS) und Purkinjezellschicht (PZS) von Fallnummer 10/76 (Alter: ein Tag postnatal). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 4.4:** Übersicht über die drei obersten Schichten des Kleinhirns und zusätzlicher Markierung von Gefäßverzweigungen (Pfeilspitzen) nach immunhistochemischem Nachweis von Kollagen IV und Gegenfärbung mit Cresylviolett. Gezeigt sind die äußere Granularzellschicht (äGZS), Molekularschicht (MS) und Purkinjezellschicht (PZS) der Fallnummer 10/88 (Alter: 10 Monate). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 4.5:** Zeichnung der Gefäßarchitektur im sich entwickelnden Kleinhirn der Ratte an den Postnataltagen (P) 4 (A), P7 (B), P10 (C), P14 (D), P18 (E) und P23 (F). EGL: äußere Granularzellschicht; ML: Molekularschicht; PL: Purkinjezellschicht; GL: innere Granularzellschicht; WM: weiße Substanz. Man beachte das völlige Fehlen von Gefäßverzweigungen in der äußeren Granularzellschicht. Die Abbildung wurde einer Publikation von Yu et al. (1994) entnommen (dort Fig. 2).

## 4.6 Abschließende Bemerkungen

In der hier vorliegenden Arbeit und den zitierten Studien von Kiessling et al. (2013a, 2013b) wurden die Kleinhirne von SIDS-Fällen und gematchten Kontrollen erstmals mit vier verschiedenen Markern und unter Einsatz modernster *design-based* stereologischer Methoden schichtenspezifisch auf das Vorliegen von Anzeichen für akute und/oder chronische Hypoxie untersucht: (i) Gesamtzahlen von Purkinjezellen; (ii) Konzentration von Calbindin-D28k in den Purkinjezellen; (iii) Mikrogefäßlängendichten; und (iv) Form und Menge von Astrozyten. Anzeichen für akute und/oder chronische Hypoxie im Kleinhirn bei SIDS fanden sich dabei keine. Leider konnte der Hirnstamm der entsprechenden Gehirne nicht mituntersucht werden, da er nicht zur Verfügung stand. Bedingt durch die enge topografische und funktionelle Nähe der Gefäßversorgung von Hirnstamm und Kleinhirn erscheint es jedoch äußerst unwahrscheinlich, dass der Hirnstamm der hier untersuchten SIDS-Fälle von Hypoxie betroffen sein sollte, das Kleinhirn aber nicht. Vielmehr erscheint es dringend geboten, die Hypothesen in der Literatur zur Beteiligung von Hypoxie im Gehirn bei SIDS (u. a. von Kinney, 2009) weiter kritisch zu überprüfen, so wie in der hier vorgelegten Arbeit zum Kleinhirn bereits geschehen. Für die weitere Forschung zu SIDS erscheint dies von erheblichem Interesse, da Hypoxie in der Pathogenese von SIDS möglicherweise eine viel geringere Rolle spielt als gegenwärtig in der Literatur angenommen.

Allerdings können keine Rückschlüsse auf funktionelle Veränderungen der Mikrogefäßarchitektur im menschlichen Kleinhirn gezogen werden. Insbesondere schließt die hier vorliegende Arbeit nicht die Möglichkeit aus, dass ein pathologischer Hirnmetabolismus im Kleinhirn von SIDS-Fällen durch andere, noch zu erforschende Mechanismen verursacht wird, der mit den hier verwendeten Methoden nicht erfasst werden konnte.



## 5. Zusammenfassung

- (i) In der hier vorliegenden Arbeit wurde experimentell die Hypothese überprüft, ob die mittlere Mikrogefäßlängendichte im Kleinhirn bei plötzlichem Kindstod (im Folgenden durchgehend als SIDS [„sudden infant death syndrome“] bezeichnet) als Ausdruck einer chronischen subklinischen Hypoxie größer ist als bei alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen (d.h. bei Kindern, die innerhalb des ersten Lebensjahres nicht an SIDS verstorben waren). Diese Hypothese basierte auf wiederholten Berichten von *post mortem* Untersuchungen in der Literatur über hypoxische Veränderungen im Gehirn bei SIDS, insbesondere im Hirnstamm, aber auch im Kleinhirn. Zwischen Hirnstamm und Kleinhirn besteht eine enge topografische und funktionelle Nähe in Bezug auf die Gefäßversorgung; so werden sowohl der Hirnstamm als auch das Kleinhirn aus Ästen der Arteriae vertebrales und der Arteria basilaris versorgt.
- (ii) Untersucht wurden insgesamt n=23 Kleinhirnhälften (je eine Kleinhirnhälfte pro Fallnummer) von Kindern, die im ersten Lebensjahr verstorben waren. Von diesen n=23 Kleinhirnhälften stammten n=9 von SIDS-Fällen (im Alter zwischen zwei und zehn Monaten verstorben), n=9 von alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen, sowie n=5 weitere von Kontrollen, die entweder in einem früheren oder einem späteren Alter als die SIDS-Fälle gestorben waren. Alle Kleinhirnhälften stammten aus einer Sammlung des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München und wurden dort in den Jahren 1999 bis 2001 durch Herrn Univ. Prof. Dr. med. Andreas Büttner (heute: Direktor des Instituts für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Rostock) im Rahmen von Autopsien gesammelt. Die Verwendung dieser Kleinhirnhälften für die vorliegende Arbeit wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock unter der Nummer A2012-0053 genehmigt.
- (iii) Für jede Kleinhirnhälfte wurde an Serien von 100 µm dicken Schnitten, die immunhistochemisch zum Nachweis von Kollagen IV aufgearbeitet und mit Cresylviolett gegengefärbt wurden, mit modernsten *design-based* stereologischen Methoden das Volumen aller Kleinhirnschichten (äußere Granularzellschicht, Molekularschicht, Purkinjezellschicht, innere Granularzellschicht, weiße Substanz) sowie die Mikrogefäßlängendichte in diesen Schichten bestimmt. Bei einer Nebenuntersuchung an weiteren Schnitten aus dem Vermis erfolgte ein immunhistochemischer Nachweis von GFAP.
- (iv) Bis auf die äußere Granularzellschicht zeigten alle Schichten des Kleinhirns mit zunehmendem Alter einen statistisch signifikanten, altersabhängigen Anstieg des Volumens. Bis auf die innere Granularzellschicht, die bei den SIDS-Fällen im Mittel

statistisch signifikant größer war als bei den gematchten Kontrollen, fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und den gematchten Kontrollen. Sowohl bei den SIDS-Fällen als auch bei den Kontrollen fand sich die höchste Mikrogefäßlängendichte in der Purkinjezellschicht, und die niedrigste Mikrogefäßlängendichte in der äußeren Granularzellschicht. Die mittleren Gefäßlängendichten der einzelnen Schichten zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und den gematchten Kontrollen. In allen fünf Kleinhirnschichten wurden altersunabhängig sowohl bei den SIDS-Fällen als auch bei den Kontrollen Gefäßverzweigungen gefunden. Der immunhistochemische Nachweis von GFAP zeigte in der Molekularschicht bei allen Altersstufen immunpositive Bergmann-Gliafasern, und in der Purkinjezellschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz bei allen Altersstufen immunpositive Astrozyten. Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und den jeweils gematchten Kontrollen lagen bei dem immunhistochemischen Nachweis von GFAP nicht vor. Insbesondere fanden sich bei den SIDS-Fällen keine Anzeichen für Astrozyten-Aktivierung wie z. B. vergrößerte Perikarien oder kürzere, erweiterte Fortsätze.

- (v) An denselben Kleinhirnen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, wurden kürzlich ebenfalls mit modernsten *design-based* stereologischen Methoden Gesamtzahlen von Purkinjezellen bestimmt sowie ein immunhistochemischer Nachweis von Calbindin-D28k in den Purkinjezellen durchgeführt (Kiessling et al. 2013a; 2013b). Auch bei diesen Untersuchungen zeigte sich kein Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und den gematchten Kontrollen. Zusammen mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit liegen somit erstmals für Kleinhirne von SIDS-Fällen und gematchten Kontrollen vier verschiedene schichtenspezifische Befunde zum möglichen Vorliegen von akuter und/oder chronische Hypoxie vor, die u. a. mit modernsten *design-based* stereologischer Methoden erhoben wurden (Mikrogefäßlängendichten, Form und Menge von Astrozyten, Gesamtzahlen von Purkinjezellen, und Konzentration von Calbindin-D28k in den Purkinjezellen). Dabei fanden sich keinerlei Anzeichen für akute und/oder chronische Hypoxie im Kleinhirn bei SIDS, so dass die eingangs formulierte Hypothese verworfen werden musste.
- (vi) Der Hirnstamm der entsprechenden Gehirne konnte leider nicht mituntersucht werden, da er nicht zur Verfügung stand. Die enge topografische und funktionelle Nähe der Gefäßversorgung von Hirnstamm und Kleinhirn macht es jedoch äußerst unwahrscheinlich, dass der Hirnstamm der hier untersuchten SIDS-Fälle von Hypoxie betroffen sein sollte, das Kleinhirn aber nicht. Vielmehr erscheint es dringend geboten, die Hypothesen in der Literatur zur Beteiligung von Hypoxie im Gehirn bei SIDS weiter kritisch zu überprüfen, so wie in der hier vorgelegten Arbeit zum Kleinhirn bereits

geschehen. Dies erscheint für die weitere Forschung zu SIDS von erheblichem Interesse, da Hypoxie in der Pathogenese von SIDS möglicherweise eine viel geringere Rolle spielt als gegenwärtig in der Literatur angenommen.

- (vii) Von Interesse war auch der Nebenfund von Gefäßverzweigungen altersunabhängig in allen fünf Kleinhirnschichten. Für die Ratte wurde nämlich in der Literatur berichtet, dass in der äußeren Granularzellschicht bis zum postnatalen Tag 18 (entspricht beim Menschen in etwa dem Ende des 1. postnatalen Lebensjahres) keine Gefäßverzweigungen auftreten. Somit zeigte die hier vorliegende Arbeit erstmals einen Unterschied in der Entwicklung der Gefäßversorgung des Kleinhirns zwischen Mensch und Ratte. Dies steht möglicherweise in Zusammenhang mit der zeitlich unterschiedlichen Bildung der Granularzellen im Kleinhirn bei Mensch (prä- und postnatal) und Nagern (nur postnatal).

## 6. Literatur

- Andersen BB, Korbo L, Pakkenberg B. A quantitative study of the human cerebellum with unbiased stereological techniques. *J Comp Neurol* 1992; 326: 549-60.
- Andersen BB, Pakkenberg B. Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2003; 182: 354-61.
- Anderson RH, Bouton J, Burrow CT, Smith A. Sudden death in infancy: a study of cardiac specialized tissue. *Br Med J* 1974; 2: 135-9.
- Ansari T, Sibbons PD, Parsons A, Rossi ML. Quantitative neuropathological analysis of sudden infant death syndrome. *Child Care Health Dev* 2002; 28 Suppl. 1: 3-6.
- Bajanowski T, Poets C. Der plötzliche Säuglingstod. *Dtsch Arztebl* 2004; 47: A 3185-90.
- Bartschat S, Fieguth A, Könemann J, Schmidt A, Bode-Jänisch S. Indicators for acute hypoxia--an immunohistochemical investigation in cerebellar Purkinje-cells. *Forensic Sci Int.* 2012; 223: 165-70.
- Benninghoff A, Drenckhahn, D. *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 2, 16. Ausgabe, Urban & Fischer, München, 2004.
- Berul CI, Perry JC. Contribution of long-QT syndrome genes to sudden infant death syndrome: is it time to consider newborn electrocardiographic screening? *Circulation* 2007; 115: 294-6.
- Biondo B, Lavezzi A, Tosi D, Turconi P, Matturri L. Delayed neuronal maturation of the medullary arcuate nucleus in sudden infant death syndrome. *Acta Neuropathol* 2003; 106: 545-51.
- Boero JA, Ascher J, Arregui A, Rovainen C, Woolsey TA. Increased brain capillaries in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 1999; 86: 1211-9.
- Byard RW, Krous HF. Research and sudden infant death syndrome: definitions, diagnostic difficulties and discrepancies. *J Paediatr Child Health* 2004; 40: 419-21.
- Calhoun ME, Mouton PR. Length measurement: new developments in neurostereology and 3D imagery. *J Chem Neuroanat* 2001; 21: 257-65.
- Carpenter R, McGarvey C, Mitchell EA, Tappin DM, Vennemann MM, Smuk M, Carpenter JR. Bed sharing when parents do not smoke: is there a risk of SIDS? An individual level analysis of five major case-control studies. *BMJ Open* 2013 28; 3. pii: e002299.
- Cruz-Sánchez FF, Lucena J, Ascaso C, Tolosa E, Quintò L, Rossi ML. Cerebellar cortex delayed maturation in sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 340-6.
- Darling RC, Smith CA, Asmussen E, Cohen FM. Some properties of human fetal and maternal blood. *J Clin Invest* 1941; 20: 739-47.
- Dunn OJ. Multiple comparisons among means. *J Am Stat Assoc* 1961; 56: 52-64.

- Elliot J, Vullermin P, Carroll N, James A, Robinson P. Increased airway smooth muscle in sudden infant death syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 313-6.
- Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1985; 8: 203-14.
- Evans A, Bagnall RD, Duflou J, Semsarian C. Postmortem review and genetic analysis in sudden infant death syndrome: an 11-year review. *Hum Pathol* 2013; 44: 1730-6.
- Foellmer HG, Madri JA, Furthmayr H. Methods in laboratory investigation. Monoclonal antibodies to type IV collagen: probes for the study of structure and function of basement membranes. *Lab Invest* 1983; 48: 639-49.
- Gilbert R, Salanti G, Harden M, See S. Infant sleeping position and the sudden infant death syndrome: systematic review of observational studies and historical review of recommendations from 1940 to 2002. *Int J Epidemiol.* 2005; 34: 874-87.
- Glaser J, Greene G, Hendricks S. *Stereology for Biological Research with a Focus on Neuroscience.* mbf Press, 2006.
- Guilleminault C, Peraïta R, Souquet M, Dement WC. Apneas during sleep in infants: possible relationship with sudden infant death syndrome. *Science* 1975; 190: 677-9.
- Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 1986; 143: 3-45.
- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147: 229-63.
- Haque AK, Mancuso MG, Hokanson J, Nguyen ND, Nichols MM. Bronchiolar wall changes in sudden infant death syndrome: morphometric study of a new observation. *Pediatr Pathol* 1991; 11: 551-68.
- Harper RM, Woo MA, Alger JR. Visualization of sleep influences on cerebellar and brainstem cardiac and respiratory control mechanisms. *Brain Res Bull* 2000; 53: 125-31.
- Hausmann R, Seidl S, Betz P. Hypoxic changes in Purkinje cells of the human cerebellum. *Int J Legal Med* 2007; 121: 175-83.
- Hills BA, Masters IB, Vance JC. A novel role for surfactant in the lung with implications for the sudden infant death syndrome. *Med Hypotheses* 1995; 44: 431-4.
- Hisaoka M, Haratake J, Nakamura Y, Itoh Y. Pancreatic islet abnormalities in sudden infant death syndrome. Qualitative and quantitative analyses of 15 cases. *Acta Pathol Jpn* 1992; 42: 870-5.
- Johanson CE. Permeability and vascularity of the developing brain: cerebellum vs cerebral cortex. *Brain Res* 1980; 190: 3-16.

- Jones KL, Krous HF, Nadeau J, Blackbourne B, Zielke HR, Gozal D. Vascular endothelial growth factor in the cerebrospinal fluid of infants who died of sudden infant death syndrome: evidence for antecedent hypoxia. *Pediatrics*. 2003; 111: 358-63.
- Kántor O, Schmitz C, Feiser J, Brasnjevic I, Korr H, Busto R, Ginsberg MD, Schmidt-Kastner R. Moderate loss of cerebellar Purkinje cells after chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Acta Neuropathol*. 2007; 113: 549-58.
- Katsetos CD, Spandou E, Legido A, Taylor ML, Zanelli SA, de Chadarevian JP, Christakos S, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Acute hypoxia-induced alterations of calbindin-D28k immunoreactivity in cerebellar Purkinje cells of the guinea pig fetus at term. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60: 470-82.
- Kiessling MC, Büttner A, Butti C, Müller-Starck J, Milz S, Hof PR, Frank HG, Schmitz C. Cerebellar granule cells are generated postnatally in humans. *Brain Struct Funct* 2013a. DOI: 10.1007/s00429-013-0565-z
- Kiessling MC, Büttner A, Butti C, Müller-Starck J, Milz S, Hof PR, Frank HG, Schmitz C. Intact numbers of cerebellar Purkinje and granule cells in sudden infant death syndrome: a stereologic analysis and critical review of neuropathologic evidence. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013b; 72: 861-70.
- Kinney HC. Neuropathology provides new insight in the pathogenesis of the sudden infant death syndrome. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 247-55.
- Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, Woltersdorf F, Masson T, Ulfing N, Schmidt-Kastner R, Korr H, Steinbusch HW, Hof PR, Schmitz C. Microvessel length density, total length, and length per neuron in five subcortical regions in schizophrenia. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 409-21.
- Kreczmanski P, Schmidt-Kastner R, Heinsen H, Steinbusch HW, Hof PR, Schmitz C. Stereological studies of capillary length density in the frontal cortex of schizophrenics. *Acta Neuropathol*. 2005; 109: 510-8.
- Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG, Mitchell EA. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 2004; 114: 234-8.
- Lamont P, Chow C, Hilton J, Pamphlett R. Differences in diaphragm fiber types in SIDS infants. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 32-7.
- Lavezzi AM, Ottaviani G, Matturri L. Ontogenesis of human cerebellar cortex and biopathological characterization in sudden unexplained fetal and infant death. *Virchows Arch* 2007; 450: 31-40.
- Liu HM, Chen HH. c-fos protein expression and ischemic changes in neurons vulnerable to ischemia/hypoxia, correlated with basic fibroblast growth factor immunoreactivity. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994; 53: 598-605.

- Machaalani R, Say M, Waters KA. Serotonergic receptor 1A in the sudden infant death syndrome brainstem medulla and associations with clinical risk factors. *Acta Neuropathol.* 2009; 117:257-65.
- Maron BJ, Clark CE, Goldstein RE, Epstein SE. Potential role of QT interval prolongation in sudden infant death syndrome. *Circulation* 1976; 54: 423-30.
- Mitchell EA, Scragg R, Stewart AW, Becroft DM, Taylor BJ, Ford RP, Hassall IB, Barry DM, Allen EM, Roberts AP. Results from the first year of the New Zealand cot death study. *N Z Med J.* 1991 27; 104: 71-6.
- Moon RY, Horne RS, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *Lancet.* 2007; 370: 1578-87.
- Mouton PR, Gokhale AM, Ward NL, West MJ. Stereological length estimation using spherical probes. *J Microsc* 2002; 206: 54-64.
- Oehmichen M, Woetzel F, Meissner C. Hypoxic-ischemic changes in SIDS brains as demonstrated by a reduction in MAP2-reactive neurons. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 267-74.
- Oehmichen M, Wullen B, Zilles K, Saternus KS. Cytological investigations on the cerebellar cortex of sudden infant death victims. *Acta Neuropathol* 1989; 78: 404-9.
- Pae EK, Chien P, Harper RM. Intermittent hypoxia damages cerebellar cortex and deep nuclei. *Neurosci Lett* 2005; 375: 123-8.
- Paterson DS, Hilaire G, Weese-Mayer DE. Medullary serotonin defects and respiratory dysfunction in sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 2009; 168: 133-43.
- Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, Chadwick AE, Krous HF, Kinney HC. Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA.* 2006; 296: 2124-32.
- Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 2005; 50: 427-34.
- Pérez-Platz U, Saeger W, Dhom G, Bajanowski T. The pathology of the adrenal glands in sudden infant death syndrome (SIDS). *Int J Legal Med* 1994; 106: 244-8.
- Rakic P, Sidman RL. Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. *J Comp Neurol* 1970; 139: 473-500.
- Rickert CH, Gros O, Nolte KW, Vennemann M, Bajanowski T, Brinkmann B. Leptomeningeal neurons are a common finding in infants and are increased in sudden infant death syndrome. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 275-82.
- Riedel A, Klekamp J, Harper C, Kretschmann HJ. Morphometric study on the postnatal growth of the cerebellum of Australian aborigines and Caucasians. *Brain Res* 1989; 499: 333-43.

- Risse M, Weiler G. [Histologic thyroid gland findings in the newborn infant and infant, with special reference to sudden infant death]. *Z Rechtsmed* 1984; 92: 205-13.
- Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3:a011643.
- Schmitz C. Variation of fractionator estimates and its prediction. *Anat Embryol (Berl)* 1998; 198: 371-97.
- Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 2005; 130: 813-31.
- Sentilhes L, Michel C, Lecourtois M, Catteau J, Bourgeois P, Laudénbach V, Marret S, Laquerrière A. Vascular endothelial growth factor and its high-affinity receptor (VEGFR-2) are highly expressed in the human forebrain and cerebellum during development. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69: 111-28.
- Shimada M, Yamano T, Nakamura T, Morikawa Y, Kusunoki T. Effect of maternal malnutrition on matrix cell proliferation in the cerebrum of mouse embryo: an autoradiographic study. *Pediatr Res* 1977; 11: 728-32.
- Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 1973; 62: 1-35.
- Siren PM, Siren MJ. Critical diaphragm failure in sudden infant death syndrome. *Ups J Med Sci* 2011; 116: 115-23.
- Squire L, Berg D, Bloom F, du Lac S, Ghosh A, Spitzer N. *Fundamental Neuroscience*. 3rd ed. Academic Press/Elsevier, Amsterdam, Boston, 2008.
- Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2006. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2006; Kapitel 2.22: 50, Kapitel 9.3.1: 239.
- Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2009. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2009; Kapitel 2.28: 57, Kapitel 9.2.1: 246.
- Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2012. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2012; Kapitel 2.2.1: 33, Kapitel 4.1.14: 128.
- Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2013. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2013; Kapitel 2.2.1: 33, Kapitel 4.1.11: 124.
- Steinschneider A. Prolonged apnea and the sudden infant death syndrome: clinical and laboratory observations. *Pediatrics* 1972; 50: 646-54.
- Takashima S, Armstrong D, Becker LE, Huber J. Cerebral white matter lesions in sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 1978; 62: 155-9.
- Vennemann MM, Loddénkötter B, Fracasso T, Mitchell EA, Debertin AS, Larsch KP, Sperhake JP, Brinkmann B, Sauerland C, Lindemann M, Bajanowski T. Cytokines and sudden infant death. *Int J Legal Med* 2012; 126: 279-84.



- Wedekind H, Bajanowski T, Friederich P, Breithardt G, Wülfing T, Siebrands C, Engeland B, Mönig G, Haverkamp W, Brinkmann B, Schulze-Bahr E. Sudden infant death syndrome and long QT syndrome: an epidemiological and genetic study. *Int J Legal Med* 2006; 120: 129-37.
- Weis J, Weber U, Schröder JM, Lemke R, Althoff H. Phrenic nerves and diaphragms in sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* 1998; 91: 133-46.
- Willinger M, James LS, Catz C. Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatr Pathol* 1991; 11: 677-84.
- Witcombe NB, Yiallourou SR, Sands SA, Walker AM, Horne RS. Preterm birth alters the maturation of baroreflex sensitivity in sleeping infants. *Pediatrics* 2012; 129: e89-96.
- Wünscher W, Wiedersberg H, Möbius G. [Significance of brain edema in sudden natural death of infants and small children]. *Padiatr Grenzgeb* 1971; 10: 213-26.
- Xu F, Severinghaus JW. Rat brain VEGF expression in alveolar hypoxia: possible role in high-altitude cerebral edema. *J Appl Physiol* 1985; 1998; 85: 53-7.
- Yu BP, Yu CC, Robertson RT. Patterns of capillaries in developing cerebral and cerebellar cortices of rats. *Acta Anat* 1994; 149: 128-33.
- Zhao T, Zhang CP, Liu ZH, Wu LY, Huang X, Wu HT, Xiong L, Wang X, Wang XM, Zhu LL, Fan M. Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells--role of hypoxia-inducible transcription factor-1alpha. *FEBS J* 2008; 275: 1824-34.

## 7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die kontinuierlich hervorragende Betreuung der Arbeit. Ich habe in dieser Zeit viel gelernt und bin dafür sehr dankbar.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Büttner für die Bereitstellung der Kleinhirne, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank danke ich für die Bereitstellung der Laborkapazitäten.

Ein ganz besonderer Dank geht an die Technischen Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls 2 der Anatomischen Anstalt der LMU München, insbesondere Frau Beate Aschauer, Frau Astrid Baltruschat, Frau Ursula Fazekas und Frau Claudia Stanglmair. Bei Frau Dr. Maren Kiessling bedanke ich mich für die kompetente Hilfe und fruchtbaren Diskussionen zum Thema SIDS.

Ebenso danke ich meiner Lebensgefährtin, Frau Marianne Müller und unseren beiden Häschen für die unermüdliche Unterstützung und Hilfe während der gesamten Zeit. Last but not least bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Frau Dr. med. Costanza Chiapponi, für Rat und Unterstützung.

## 8. Eidesstattliche Versicherung

Müller-Starck, Jens Matthias

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Dichte von Mikrogefäßen im Kleinhirn beim plötzlichen Kindstod**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 28.01.2014

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand